

**UNIVERSITE DE SAAD DAHLEB DE BLIDA**

**Faculté des Sciences Agronomiques et Vétérinaire**

Département des Sciences Agronomiques

## **MEMOIRE DE MAGISTER**

Spécialité : Protection des Végétaux  
Option : Phytopathologie

**INFLUENCE DU “HAIRY ROOT” SUR LA CROISSANCE DU  
POMMIER ET ANALYSE DU POUVOIR RHIZOGENE DE  
SOUCHES D'*Agrobacterium* spp. ISOLEES DU SOL.**

Par

**AZIL Nadia**

Devant le jury composé de

A. BOUTEKRABT	Professeur, U. de Blida	Président
F.Z. CHAOUCH	Maître de conférence, U. de Blida	Examinatrice
L. KHELIFI	Maître de conférence, I.N.A.	Examineur
M. BENCHABANE	Maître de conférence, U. de Blida	Examineur
Z. KRIMI	Maître de conférence, U. de Blida	Promotrice

Blida, 27 Octobre 2008

## RESUME

Le hairy root est une maladie néoplasmique causée par *Agrobacterium rhizogenes*. L'analyse de la fréquence de la maladie sur le système racinaire du pommier dans trois pépinières; Chebli, Boufarik et Soumaa a révélée la présence du hairy root sur trois porte greffes ; MM106, MM111 et EM9 à des fréquences respectivement homogènes (22,21%, 19,49% et 22,93%). Le phénotype du hairy root sur le porte greffe MM106 se caractérise par un nombre élevé de sites rhizogènes induisant une augmentation du nombre de racines secondaires ainsi que leur élongation. Par conséquent, un effet positif s'est manifesté sur la croissance de la variété Golden delicious greffée sur ce génotype. Par contre, le hairy root n'a présenté aucun effet sur la croissance du même greffon associé au porte greffe récalcitrant EM9.

L'analyse *in vitro* du pouvoir rhizogène de 70 souches d'*Agrobacterium* spp. effectuée sur des disques de carotte à révélé 42 souches rhizogènes. Onze souches les plus virulentes ont été sélectionnées afin d'effectuer l'induction racinaire sur des axes hypocotylés de *Datura stramonium* var. tatula. Cette étude a montré une variabilité de réponse. L'évaluation du pouvoir rhizogène a porté sur des critères phénotypiques basés sur le diamètre, le nombre de racines et le temps d'apparition de la première racine. Par ailleurs, le taux d'induction racinaire et le taux de réactivité ont été calculés et comparés à ceux de la souche d'*Agrobacterium rhizogenes* de référence A4. Les résultats obtenus et leur classification hiérarchique révèlent une variabilité de performance des souches en fonction des paramètres considérés.

La classification hiérarchique précédée par l'analyse des composantes principales, a permis de faire une organisation en quatre groupes des différentes souches bactériennes selon les quatre paramètres étudiés. La souche EKR414 semble être la moins performante, surtout en termes de taux d'induction. Elle est suivie par les souches PKR23, PKS34, F14 et C13 qui sont plus performantes pour les diamètres des racines induites, alors qu'elles présentent un taux d'induction modéré. Un troisième groupe constitué par B32, H11 et E32 avec des réponses hétérogènes et enfin les souches PKS411, PKR22, PKS213 et A4. Ces dernières souches présentent les mêmes capacités d'induction racinaire que la souche de référence A4.

**Mots clés :** *Agrobacterium rhizogenes*, pommier, induction racinaire, hairy root, *Datura stramonium*.

## Summary

Hairy root is a neoplastic disease caused by *Agrobacterium rhizogenes*. The analysis of disease's frequency about the root's system of apple trees in three nursery: Chebli, Boufarik and Soumaa has revealed the presence of Hairy root for three grafts; MM106, MM111 and EM9 at homogenous rates (22,21%, 19,49% and 22,93%). The Hairy root's phenotype of the graft MM106 is characterized by a higher number of rhizogenes sites inducing increase of secondary root number then their length. However, a positive effect has been shown on the growth of golden delicious variety grafted on this genotype. But the Hairy root hasn't presented any effect on the growth of the same graft associated to EM9.

The analysis of *in-vitro* rhizogene power done on carrot disks of 70 strains of *Agrobacterium* spp. has revealed 42 rhizogenes strains. Eleven of them are the most virulent, adding the A4 has been selected to root's induction, on the hypocotyls axes of *Datura stramonium* var. *tatula*. This study has shown the variability of responses, the evaluation of the rhizogenes power has carried on the phenotype characters based on the diameter, number of roots and the time of the first root apparition, more over the rate of root induction and the raite of reactivity have been calculated and compared to those of the reference A4 *Agrobacterium rhizogenes*. The obtained results and their hierarchical classification revealed variability in the strains performance in function of the considered parameters.

The hierarchical classification preceded by the analysis of the principals compounds allowed to do a classification in four classes of the different bacteria strain according to the four studied parameters. the EKR414 strain seems been the less efficient, mostly in the rate of induction. it is followed by the strains; PKR23, PKS34, F14 and C13 which are the most performing in the diameter of the induced roots, even when they showed a reduced induction rate, a third group constituted by : B32, H11 and E32 with heterogenic responses and finally the strains PKS411, PKR22, PKS213 and A4. these one strains present the same capacity of root's induction as the strain's reference A4.

**Keywords** : *Agrobacterium rhizogenes*, apple tree, root inducing, hairy root, *Datura stramonium*.

## ملخص

إن تحليل انتشار مرض الجذور المتشعبة الذي يسببه *Agrobacterium rhizogenes* على جذور شجرة التفاح في ثلاث مشاتل : الشبلي ، بوفاريك و الصومعة ، قد كشف عن وجود هذا المرض على ثلاث حاملي الطعم وهم : EM9, MM111, MM106 بنسب متماثلة كالتالي : ( 22,21% ، 19,49% و 22,93%). إن الشكل الخارجي للجذور المتشعبة على حامل الطعم MM106 يتميز بعدد مرتفع من مواقع تشكل الجذور، مسببا بذلك تزايد عدد الجذور الثانوية وكذا تماطلها. الذي ينتج عنه تأثير إيجابي على نمو الصنف Golden delicious المطعم على هذا النمط الوراثي. بالمقابل، هذا المرض لم يكن له أي تأثير على نمو نفس الصنف المطعم على EM9.

إن التحليل *in vitro* لقدرة على مد الجذور ل 70 صنف بكتيري لـ *Agrobacterium spp.* على أفراس الجزر، قد كشف عن وجود 42 صنف بكتيري ، حيث اختير 11 صنف بكتيري الأكثر حدة و تطبيقتها على قطع من ساق *Datura stramonium var. tatula* . هذه الدراسة أعطت عدة أجوبة. التقييم للقدرة على نمو تشعب الجذور كان على أساس معايير الشكل الخارجي و هي : القطر ، عدد الجذور و وقت ظهور أول جذر . فضلا عن ذلك، فإن نسبة حث نمو الجذور الثانوية المتشعبة و نسبة رد الفعل قد قومت و قورنت بتلك النسب المتعلقة بالصنف *Agrobacterium rhizogenes* المرجع A4.

النتائج المحصلة وترتيبها التسلسلي، كشف عن تنوع فعالية الأصناف البكتيرية تبعا للمعايير المتبعة. إن الترتيب التسلسلي للأصناف البكتيرية قد سمح بترتيبها ضمن أربعة مجموعات على حسب الأربع معايير المدروسة . حيث أن الصنف EKR<sub>414</sub> هي الأقل تأثيرا، متبوعة بالأصناف PKR<sub>23</sub> ، PKS<sub>34</sub> ، F<sub>14</sub> و C<sub>13</sub>. المجموعة الثالثة متكونة من B<sub>32</sub> ، H<sub>11</sub> و E<sub>32</sub> بأجوبة مختلفة. وأخيرا الأصناف PKR<sub>22</sub> ، PKS<sub>411</sub> و PKS<sub>213</sub> التي تعطي نفس القدرة على نمو الجذور المتشعبة للصنف المرجع A4.

## REMERCIEMENTS

A l'issue de ce travail, je tiens à exprimer mes remerciements et ma profonde gratitude à tous ceux qui m'ont aidé à le réaliser.

En premier lieu, je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Dr. KRIMI Zoulikha, pour avoir accepté la direction de ce travail, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de phytobactériologie et de m'avoir guidé avec une grande patience tout au long de ce travail. Je la remercie également, pour ses précieux conseils, ses encouragements et pour son aide lors de la rédaction de ce manuscrit.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur A. Boutekrabt, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Mes remerciements vont également au Dr. F.Z Chaouch, Maitre de conférence à l'université de Blida pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens également à exprimer ma gratitude au Dr. L. Khelifi, Maitre de conférence à l'I.N.A., pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire d'Amélioration des Ressources Génétiques, de m'avoir encouragé et accepté d'évaluer ce travail et de participer au jury.

Mes sincères remerciements vont également au Dr. M. Benchabane, Maitre de conférence à l'Institut d'Agronomie de Blida, pour avoir accepté d'être membre de jury pour juger ce travail.

Mes vifs remerciements et mon profond respect vont à Monsieur R. Amdoun, pour sa disponibilité, ses aides, ses conseils et pour le temps qu'il a consacré pour les calculs statistiques.

Je ne saurai oublier dans mes remerciements, tous mes camarades du laboratoire de phytobactériologie et du laboratoire d'Amélioration des Ressources Génétiques de l'I.N.A, pour leur aide, leurs encouragements et leur soutien moral.

J'adresse ma gratitude A Melle Zaoui Djamila, l'ingénieur de laboratoire d'Amélioration des Ressources Génétiques de l'I.N.A. qui m'a aidé tout au long de mon expérimentation.

Je remercie profondément Monsieur Zitoun Directeur de la CRAPPS, ainsi que l'Ingénieur Mouna, Dahmane chef de culture et l'ensemble du personnel de la CRAPPS de CHEBLI, Mr. Zitouni Propriétaire de la pépinière de SOUMAA et Mr. Rabia Propriétaire de la pépinière de BOUFARIK pour leur accueil chaleureux leurs aides et les facilités qu'ils m'ont procuré pour réaliser les prospections sur le terrain.

Un grand merci à YACINE et NASSEREDDINE pour leur aide précieuse.

A mes parents, mes frères et ma sœur.

Enfin, ma sympathie va vers mes amis et collègues en particulier ceux de la promotion DEUA (1996-1997).

## TABLE DES MATIERES

RESUME.....	1
REMERCIEMENTS.....	5
TABLE DES MATIERES.....	7
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX.....	8
INTRODUCTION GENERALE.....	9
1. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR <i>Agrobacterium</i> spp., LA MALADIE DU CHEVELU RACINAIRE ET SON APPLICATION EN BIOTECHNOLOGIE.....	12
1.1. Le genre <i>Agrobacterium</i> spp.....	12
1.2. Le plasmide Ri et son implication dans le pouvoir rhizogène.....	18
1.3. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> et la maladie du hairy root chez les arbres fruitiers à pépins.....	29
1.4. Utilisation d' <i>Agrobacterium rhizogenes</i> et son plasmide Ri en biotechnologie végétale.....	35
2. MATERIEL ET ETHODES.....	41
2.1. Fréquence des symptômes du 'hairy root' dans quelques pépinières d'arbres fruitiers à pépins.....	41
2.2. Sélection de souches d' <i>Agrobacterium</i> spp. rhizogènes.....	48
2.3. Etude du pouvoir d'induction racinaire des souches d' <i>Agrobacterium</i> spp. sélectionnées.....	52
2.4. Traitements statistiques et analyse des résultats.....	54
3. RESULTATS ET INTERPRETATION.....	57
3.1. Fréquence des symptômes du 'hairy root' dans quelques pépinières d'arbres fruitiers à pépins.....	57
3.2. Pouvoir rhizogène des souches d' <i>Agrobacterium</i> spp. ....	62
3.3. Pouvoir d'induction racinaire des souches d' <i>Agrobacterium</i> spp. sélectionnées, sur le <i>Datura</i> .....	66
4. DISCUSSION GENERALE.....	73
CONCLUSION GENERALE.....	82
APPENDICES.....	86
REFERENCES.....	101

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1 :	Carte génétique du plasmide pRi1724.....	20
Figure 1.2 :	Carte génétique du plasmide pRiA4 d' <i>A. rhizogenes</i> et organisation des deux fragments du T-DNA .....	22
Figure 1.3 :	Symptômes de hairy root sur le pommier en conditions naturelles.....	30
Figure 2.1 :	Représentation schématique d'une racine avec 4 sites comportant plusieurs départs de racines chevelues .....	47
Figure 2.2 :	Préparation des disques de carotte pour l'inoculation .....	51
Figure 2.3 :	Etapes de préparation des axes hypocotylés pour l'induction racinaire .....	52
Figure 3.1 :	Racines chevelues (hairy root) sur le système racinaire de trois porte greffes de pommier : MM106, EM9 et MM111.....	58
Figure 3.2 :	Effet du hairy root sur le nombre moyen de sites rhizogènes, le nombre moyen de racines secondaires et la longueur des racines secondaires du porte greffe MM106.....	60
Figure 3.3 :	Effet du hairy root sur la croissance des tiges de la variété Golden delicious greffée sur MM106 et EM9.....	61
Figure 3.4 :	Pouvoir pathogène (rhizogène) des souches testées sur disques de carotte.....	63
Figure 3.5 :	Caractérisation du pouvoir rhizogène des souches d' <i>Agrobacterium</i> spp. sélectionnées sur la base du nombre, la longueur et le diamètre moyens de racines chevelues produites sur les disques de carotte.....	65
Figure 3.6 :	Rhizogénisation du <i>Datura stramonium</i> var. tatula.....	67
Figure 3.7 :	Analyse en composantes principales (ACP) des souches bactériennes selon les paramètres étudiés .....	70
Figure 3.8 :	Dendrogramme des douze souches bactériennes étudiées.....	72
Tableau 2.1 :	Pépinières prospectées et porte greffes analysés.....	45
Tableau 2.2 :	Porte greffes et variétés associés étudiée pour les paramètres de croissance.....	48
Tableau 3.1 :	Estimation par porte greffe et par pépinière de la proportion de plants atteints par le hairy root .....	57
Tableau 3.2 :	Classement monocaractères des souches bactériennes d' <i>Agrobacterium rhizogenes</i> selon les paramètres analysés.....	68
Tableau 3.3 :	Matrice de corrélation des souches étudiées selon les paramètres mesurés.....	69
Tableau 3.4 :	Valeurs propres et taux de variance des 04 axes.....	69



## INTRODUCTION GENERALE

*Agrobacterium* spp. est un genre appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*, il regroupe des bactéries Gram-négatives vivant dans le sol et la rhizosphère des plantes. Les deux espèces les plus connues sont *A. tumefaciens* et *Agrobacterium rhizogenes* qui sont des pathogènes pour de nombreuses plantes Dicotylédones.

La maladie du hairy root est provoquée par l'infection des blessures des plantes par *Agrobacterium rhizogenes*. Cette bactérie transfère le segment T-DNA à partir du plasmide Ri vers le génome de la plante infectée. Ce T-DNA porte un ensemble de gènes qui codent pour les enzymes contrôlant la fonction oncogène et la fonction de biosynthèse des auxines, des cytokinines et des opines. La nouvelle balance hormonale induit la formation de proliférations racinaires nommée hairy root qui émergent du site des blessures. La gamme d'hôtes de cette bactérie est la même que celle d'*Agrobacterium tumefaciens* [1, 2, 3].

La maladie du hairy root présente deux traits originaux qui conditionnent son étude: le premier est celui du support plasmidique des déterminants de la virulence. Celle-ci est, en effet, conférée en grande partie à l'hôte bactérien par un gros plasmide auto-transférable, le plasmide Ri. Le transfert de ce plasmide suffit généralement à conférer des propriétés pathogènes à la bactérie réceptrice si celle-ci appartient au genre *Agrobacterium*. De ce fait, le plasmide Ri apparaît comme l'agent pathogène véritable du hairy root alors que la bactérie qui l'héberge en serait seulement le vecteur.

Le second trait original vient du fait que le hairy root nommé communément racines chevelues, résulte de la modification du génome des cellules de la plante infectée, par de l'ADN bactérien (le T-DNA). Une des conséquences de ce phénomène rare de flux de gènes inter-règne, est que la présence de la bactérie pathogène n'est indispensable qu'au début de l'infection. Le phénotype rhizogène en effet, persiste après la disparition de l'organisme agresseur.

Le phénotype du hairy root est caractérisé par une croissance rapide indépendamment des hormones endogènes, des ramifications latérales agéotropes et une grande stabilité génétique. Très peu de données de recherche sur la maladie du hairy root et son effet sur la physiologie de la plante affectée ont été rassemblées.

Quelques auteurs ont présenté l'évidence que la formation de racines secondaires induites par *A. rhizogenes* peut avoir des effets bénéfiques sur les plantes infectées. C'est ainsi que l'infection *in vitro* par *Agrobacterium rhizogenes* à la base des microlésions peut augmenter l'enracinement de quelques espèces fruitières à savoir les espèces récalcitrantes telles que le pommier [4], l'amandier [5] et l'olivier [6]. Les résultats obtenus par plusieurs expérimentations ont montré un meilleur taux de croissance, un rendement appréciable et une meilleure résistance à la sécheresse par rapport aux lots témoins non inoculés [7, 8].

Ainsi, plusieurs auteurs ont rapporté qu'*A. rhizogenes* a été utilisé pour transformer diverses espèces ornementales. Cependant, le phénotype altéré peut être avantageux en floriculture et en horticulture [9].

Par conséquent, l'infection naturelle ou artificielle en utilisant cette 'pathogénie' offre des potentiels considérables en agriculture, particulièrement dans les régions arides. Cette approche peut être améliorée par une introduction stable des gènes d'induction racinaire dans les plantes par le génie génétique [10].

Le système de hairy root est stable et hautement productif de métabolites secondaires sous les conditions de culture sans hormones. La croissance rapide, la multiplication dans un temps court, l'entretien facile et la capacité de synthétiser une gamme de composés chimiques des cultures de hairy root, offre des avantages additionnels comme sources continue de métabolites secondaires précieuses.

Les hairy root sont aussi une source précieuse de produits phytochimiques utiles tel que les additifs pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires. Ces racines peuvent aussi synthétiser plus d'un seul métabolite et par conséquent, permettent d'optimiser la production commerciale.

Plusieurs plantes médicinales ont été transformées avec succès par *Agrobacterium rhizogenes* et l'induction du hairy root montre relativement une haute productivité de métabolites secondaires, qui sont potentiellement importants pour les produits pharmaceutiques.

Le présent travail se propose d'étudier :

1. L'incidence du phénotype du hairy root dans trois pépinières cultivant une plante hôte de cette maladie à savoir, le pommier et son influence sur la croissance. Dans le même aspect de travail, nous avons caractérisé certains paramètres morpho métriques du phénotype de hairy root sur le porte greffe MM106 du pommier cultivé en pépinière ;
2. Dans la deuxième partie nous avons analysé le pouvoir rhizogène d'une population d'*Agrobacterium* spp. appartenant au biovar 2, par inoculation sur des disques de carotte et par la même sélectionné les souches les plus performantes ;
3. Une dernière partie a été dédiée à l'induction racinaire sur une plante productrice de métabolites secondaires, qu'est le *Datura* par les souches sélectionnées antérieurement.

## CHAPITRE I

### DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR AGROBACTERIUM SPP., LA MALADIE DU CHEVELU RACINAIRE ET SON APPLICATION EN BIOTECHNOLOGIE

#### 1.1. Le genre *Agrobacterium* spp.

Le genre *Agrobacterium* appartient à la famille des *Rhizobiaceae*, il regroupe des bactéries Gram négatif, vivant dans le sol et la rhizosphère des plantes. Les espèces phytopathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium vitis*, *Agrobacterium rubi*, et *Agrobacterium fici* induisent des proliférations anormales des cellules végétales ou tumeurs au niveau du collet, des racines ou de la partie aérienne des plantes; maladie connue sous le nom de crown gall ou galle du collet. D'autres sont responsables de la prolifération de racines nommées chevelus racinaires ou 'hairy root' chez certaines espèces végétales, elles sont induites par *Agrobacterium rhizogenes*. Un dernier groupe de bactéries appartenant à l'espèce *Agrobacterium radiobacter* sont non pathogènes.

Dans les deux cas de maladies citées ci dessus, le support du pouvoir pathogène est un plasmide et le mécanisme d'infection est très particulier. En effet, il s'agit d'un phénomène de transgènesè naturelle dans lequel la bactérie transforme génétiquement les cellules végétales infectées. Il s'agit là d'un transfert d'information génétique entre une cellule procaryote et une cellule eucaryote.

#### 1.1.1 Caractéristiques du genre *Agrobacterium* spp.

Le genre *Agrobacterium* fait partie de la sous-classe alpha 2 des *Proteobacteria* et à la famille des *Rhizobiaceae* [11]. Il regroupe des bactéries, en forme de bacille, aérobies, Gram négatif, asporulées et mobiles grâce à la présence d'un à six flagelles pérित्रiches [12].

Le genre *Agrobacterium* regroupe donc les populations de bactéries que nous appelons communément agrobactéries. Elles vivent comme saprophytes dans le sol et plus particulièrement dans la rhizosphère. Elles ont pu être isolées partout dans le monde [11].

### 1.1.2 Taxonomie du genre *Agrobacterium* spp.

La taxonomie du genre *Agrobacterium* a été peu claire pendant longtemps. Plusieurs classifications ont été proposées :

#### 1.1.2. 1 Classification phytopathologique

Pendant plusieurs années la classification des espèces appartenant au genre *Agrobacterium* fût basée sur les propriétés phytopathogènes et le type de symptômes induits. Régulièrement remaniée, elle distingue globalement six espèces :

***A. tumefaciens***, l'espèce la plus connue, agent du crown gall induisant des tumeurs au niveau du collet (Smith et Townsend, 1907, cité par [13]),

***A. rhizogenes***, responsable d'une maladie appelée 'hairy root', caractérisée par une prolifération racinaire sur les plantes contaminées,

***A. rubi*** incluant les souches responsables du 'cane gall' induisant la formation de tumeurs aériennes sur tiges de *Rubus* sp. [12],

***A. vitis***, initialement considéré comme le biovar 3 d' *A. tumefaciens* ; inféodé à la vigne [14],

***A. fici*** aussi appelé ***A. larrymorei***, espèce inféodée à *Ficus benjamina* [15],

et ***A. radiobacter***, regroupant des souches non pathogènes [11].

La découverte, dans les années 1970-1980, de la corrélation entre le pouvoir pathogène et la présence d'un méga-plasmide transférable, a obligé à reconsidérer la taxonomie [16]. En effet, cette classification basée sur des critères phytopathologiques est fondée, sur des caractères liés à un élément mobile du génome, le plasmide pathogène (pTi ou pRi). Sa validité est donc très discutable

puisqu'il est possible de transformer une souche d'*A. radiobacter* non pathogène en *A. tumefaciens* en y introduisant un plasmide Ti par conjugaison [17].

Par conséquent, dans la taxonomie phytopathogène, le statut d'espèce d'une souche particulière d'*Agrobacterium* peut changer à cause de la perte ou l'acquisition du plasmide induisant la tumeur ou le chevelu racinaire.

#### 1.1.2.2. Classification en biovar, sur des critères physiologiques et biochimiques

Une classification complémentaire fondée sur des caractères chromosomiques considérés comme éléments stables, a également été établie constituant ainsi une taxonomie phénotypique du genre. Elle considère trois biovars ou biotypes, chaque biovar étant défini par des critères biochimiques [18, 12].

Ainsi, le genre *Agrobacterium* a été divisé en :

- **Biovar 1** ; souches « 3 céto-lactose positives » pour leur grande majorité, incluant les espèces *A. tumefaciens* et *A. radiobacter* [19],
- **Biovar 2** ; souches « 3 céto-lactose négatives » incluant les souches de l'espèce *A. rhizogenes*,
- **Biovar 3** ; souches de l'espèce *A. vitis* [14], et les souches de l'espèce *A. rubi*.

Cependant le résultat de diverses études taxonomiques basées sur des méthodes classiques ; chimiotaxonomiques [20, 21], numériques et moléculaires comme l'hybridation d'ADN [22], l'analyse de la séquence du 16S et la séquence 23S de l'ARN ribosomique [19] indique que l'identité d'*Agrobacterium* en biovars est un trait taxonomique fiable.

Les études précédemment citées montrent aussi que le genre *Agrobacterium* est étroitement lié et apparenté avec les bactéries appartenant au genre *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* [23]. Basées sur ces résultats, différentes propositions de changement de la nomenclature d'*Agrobacterium* ont été présentées. Young et ses collaborateurs [23] ont suggéré de rejeter cette dernière et d'inclure *Agrobacterium* au genre *Rhizobium*. Cependant, cette

proposition n'a pas été acceptée par l'ensemble de la communauté. Nous préférons par conséquent utiliser la nomenclature d'*Agrobacterium* au lieu de *Rhizobium*.

### 1.1.2.3 Classification sur des bases moléculaires: hybridation ADN/ADN

Plusieurs auteurs proposent d'utiliser des méthodes autres que celles présentées plus haut, afin de mettre en place une taxonomie fondée sur les caractéristiques génotypiques des souches. L'hybridation moléculaire ADN/ADN permet de comparer, indirectement les séquences nucléotidiques de deux génomes. Son principe repose sur la propriété des brins complémentaires de deux molécules d'ADN dénaturées de s'associer, s'ils présentent une similarité suffisante dans leur séquence [24].

Ainsi, l'espèce bactérienne a été définie par le Comité International de Bactériologie Systématique comme un ensemble de souches ayant des homologues ADN/ADN se traduisant par des pourcentages d'hybridation supérieurs ou égaux à 70%. Une autre méthode, reposant sur la comparaison des séquences du gène déterminant l'ARN ribosomique 16S (*rrs16S*), est de plus en plus employée [22].

Pour résumer cette taxonomie fondée sur des caractéristiques génétiques, le genre *Agrobacterium* peut être regroupé, pour la grande majorité des souches, au sein de trois biovars :

- le **biovar 1**, souches essentiellement 3 céto-lactose positives, incluant à ce jour les espèces *A. tumefaciens* et *A. radiobacter*. Les résultats d'hybridation ADN/ADN ont montré l'existence d'au moins 9 groupes d'hybridation, dont un groupe incluant les deux souches types des deux espèces,
- le **biovar 2** incluant uniquement les souches de l'espèce *A. rhizogenes*,
- le **biovar 3** incluant les souches de l'espèce *A. vitis*. A ces trois biovars, il convient de rajouter les quelques souches de l'espèce *A. rubi*.

#### 1.1.2.4 Classification selon le type de plasmides

Il est bien connu que les bactéries appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* hébergent des éléments extra chromosomiques de grande taille nécessaires pour l'interaction avec la plante hôte dans les processus de pathogénicité ou bien dans les relations de type symbiotiques. Chez *Agrobacterium* spp. l'infection ne se produit dans les cellules végétales cibles que par le transfert de la région oncogénique T-DNA du plasmide Ri ou du plasmide Ti respectivement hébergés par *Agrobacterium rhizogenes* ou par *Agrobacterium tumefaciens* [25].

Les plasmides chez le genre *Agrobacterium* et les fonctions des gènes portés par ces derniers ont servi pour la classification. De ce fait, trois types de plasmides pathogènes sont connus chez le genre *Agrobacterium* : le plasmide Ti, le plasmide Ri et le plasmide Tar.

##### 1.1.2.4.1 Le plasmide Ti

Les plasmides Ti (Tumor-inducing) sont des mégaplasmides (200 à 500 kb) présents dans des bactéries telluriques appartenant au genre *Agrobacterium*. Ces plasmides constituent les éléments pathogènes clefs de la bactérie. Au cours de l'infection, un fragment d'ADN du plasmide Ti, appelé ADN-T (ou T-DNA) ; 'ADN de transfert' 'est transféré de la bactérie vers la plante sous l'action des produits des gènes de virulence, eux aussi portés par le plasmide Ti [26]. Le T-DNA est ensuite intégré dans le matériel génomique des cellules végétales. Ce transfert d'ADN conduit à une modification de l'information génétique de la plante hôte, ce qui entraîne une modification des activités mitotiques et métaboliques des cellules végétales aboutissant à un phénotype tumoral [17]. Sur le plan fonctionnel, ils comportent trois régions essentielles pour l'interaction avec la plante : le T-DNA (gènes de synthèse d'opines et les oncogènes), la région de virulence et la région de catabolisme des opines.

Le plasmide chez *A. tumefaciens* a été nommé plasmide Tumor inducing (Ti). Deux zones distinctes le composent. La portion qui est transférée dans l'ADN de la plante hôte est appelée T-DNA, la portion qui code pour les facteurs



nécessaires à ce transfert est appelée la région de virulence (*vir*). Les distinctions principales entre les différents T-DNA proviennent du type d'opines dont ils codent, les enzymes responsables de leur synthèse. Les tumeurs proviennent de la synthèse d'auxines et de cytokinines par certains *loci* du T-DNA exprimés dans la plante [17].

#### 1.1.2.4.2 Le plasmide Tar

Les souches d'*Agrobacterium vitis* ont, quant à elles, la particularité d'héberger des plasmides qui leur confèrent la capacité de cataboliser le tartrate, acide particulièrement abondant chez la vigne à la différence des autres végétaux [27]. Les gènes codant cette fonction sont portés par des plasmides appelés pTar. Cette fonction pourrait jouer un rôle dans la spécificité d'hôte.

L'enzyme responsable de la dégradation de l'acide tartrique est codée par des gènes localisés dans la région *TAR* [27]. Trois types de plasmides conjugatifs de tartrate ont été définis; pTrAB3 (245 Kb), pTiAB3 (234 Kb), et le pTrAB4 (170 Kb) [28]. Comme pour les plasmides Ti, les régions *TAR* sont généralement sous le contrôle chromosomique [29]. En effet, ces mêmes auteurs signalent l'existence de quelques souches, peu nombreuses, d'*Agrobacterium vitis* possédant un type de plasmide, le pTiAB3 qui porte simultanément les gènes oncogènes se trouvant dans le plasmide Ti et la région *TAR* responsable de l'utilisation du tartrate [30]. Le plasmide pTiAB3 est le seul type de plasmide pouvant contenir les deux fonctions en même temps.

#### 1.1.2.4.3 Le plasmide Ri

La classification des plasmides Ri est établie comme celle des plasmides Ti, selon le type d'opines synthétisées. Les plasmides Ri codent des enzymes pour la synthèse des opines, qui sont des dérivés des sucres et des acides aminés. Différentes souches d'*A. rhizogenes* sont classées par les gènes de synthèse d'opines. Les plasmides Ri de type agropine, cucumopine, ou mannopine ont été décrits par Petit et al., [31].

Les gènes requis pour l'expression du phénotype rhizogène sont localisés sur le plasmide Ri hébergé par *Agrobacterium rhizogenes*. Desquels une partie T-DNA est transférée puis intégrée dans le génome de la plante [17, 32]. Le T-DNA contient des gènes qui vont par la suite s'exprimer dans les cellules végétales transformées. Le plasmide root inducing (Ri) d'*Agrobacterium rhizogenes* montre beaucoup de similarités au plasmide tumor inducing (Ti), y compris l'organisation presque identique des opérons *vir* [33]. Une exception remarquable à cette règle est l'absence de *virE1* et *virE2* pour le plasmide Ri chez certaines souches d'*Agrobacterium rhizogenes* [34, 35, 36, 37].

D'une manière générale, le plasmide Ri comporte deux T-DNA; le TR-DNA qui est similaire au Ti-DNA et la région TL-DNA. La classification des plasmides Ri est établie comme celle des plasmides Ti, selon le type d'opines synthétisées.

### 1.2. Le plasmide Ri et son implication dans le pouvoir rhizogène

La maladie néoplasmiqne nommée racines chevelues ou 'hairy root' est incitée par les bactéries phytopathogènes appartenant à l'espèce *A. rhizogenes*. Bien que le mécanisme du transfert moléculaire du T-DNA vers la plante est très identique à celui d'*A. tumefaciens*, les bases physiologiques de la tumorigénèse sont fondamentalement différentes.

Les tumeurs de la galle du collet résultent d'une surproduction d'auxines et de cytokinines spécifiques qui sont des phytohormones codées par les gènes du T-DNA d'*A. tumefaciens*. Bien que le T-DNA de quelques plasmides Ri d'*A. rhizogenes* contient les gènes d'auxines biosynthétiques, ces loci ne sont pas toujours nécessaires pour la formation du hairy root. Les expérimentations récentes suggèrent que les tumeurs du hairy root résultent de la sensibilité élevée des cellules transformées vis-à-vis du taux d'auxines endogènes [38].

### 1.2.1. Structure du plasmide Ri

Plusieurs plasmides chez *Agrobacterium rhizogenes* ont été décrits dans la littérature, nous pouvons citer le pRi de la souche A4, le pRi de la souche 1724 et le pRi de la souche 8196.

La structure du génome du plasmide Ri a été peu étudiée à l'exception des gènes du T-DNA et les gènes *vir* [39, 38]. Le génome entier du pRi 1724, de taille 217,6 kb de type mikimopine d'*Agrobacterium rhizogenes*, de la souche MAFF 03-01724 a été complètement séquencé (Figure 1.1).

Pour comprendre la structure générale des oncogènes du T-DNA, la séquence complète du nucléotide du plasmide Ri de type mikimopine; pRi 1724 a été analysée et étudiée pour les raisons suivantes [40, 41] :

- Il présente une forte capacité de transférer l'ADN-T et l'induction racinaire, malgré sa petite taille par rapport au plasmide Ri de type agropine pRi A4 [42]. Ce qui garantit un séquençage rapide du nucléotide et une prédiction facile de l'organisation minimale des gènes du plasmide Ri dans la nature.
- Parce qu'il n'y a pas le type mikimopine chez les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* hébergeant un plasmide Ti, il est envisagé pour présenter le type d'opine spécifique du plasmide Ri. Ainsi, en prévoyant son évolution, nous pouvons exclure la possibilité du transfert des gènes entre le plasmide Ti et le plasmide Ri.
- En plus des gènes *rol* et ORF13, tous deux oncogènes, ils sont présents dans le T-DNA d'*A. rhizogenes* du pRi 1724; la séquence de ORF13 est hautement conservée dans le type agropine, mannopine cucumopine et mikimopine du plasmide Ri.

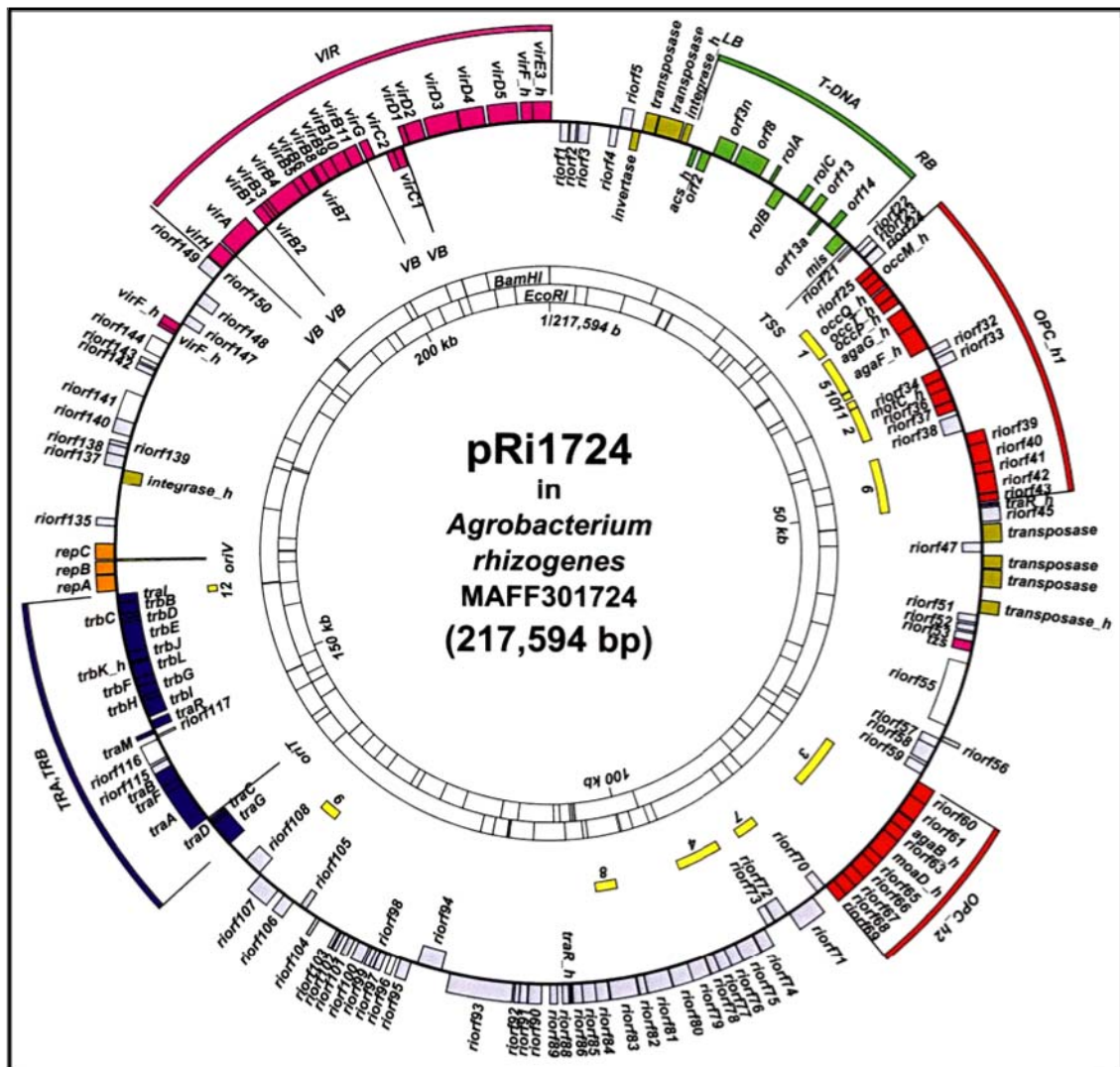


Figure 1.1 : Carte génétique du plasmide pRi1724 selon Tsudzuki [43].

### 1.2.2 Les différentes régions du plasmide Ri

Les souches d'*A. rhizogenes* les plus anciennement étudiées sont A4 et 8196. La souche 8196 contient un seul T-DNA, qui n'a aucune homologie avec le T-DNA d'*A. tumefaciens*. La souche A4 contient deux T-DNA, nommés Ri-TR-DNA et Ri-TL-DNA [44] (Figure 1.2). Le Ri-TR-DNA est très proche du T-DNA d'*A. tumefaciens*. Le Ri-TL-DNA présente quelques homologies avec le Ri-T-DNA de la souche 8196 d'*A. rhizogenes*. Le Ri-TL-DNA pourrait être suffisant pour induire la maladie du hairy root.

Il a été montré l'absence de Ri-TR-DNA dans des plantes transformées avec la souche A4 d'*A. rhizogenes* [45]. Le Ri-TR-DNA, qui est responsable de la production d'auxines et de cytokinines, stimulerait l'action du Ri-TL-DNA, ce qui suggère des modes d'infection entraînant les symptômes de la maladie complètement différents entre *A. tumefaciens* et *A. rhizogenes*.

Les plasmides Ri d'*A. rhizogenes* peuvent simultanément porter un à plusieurs T-DNAs différents. Ainsi, le plasmide Ri chez la souche 8196 de plasmide Ti de type mannopine contient un seul T-DNA, qui code pour neuf gènes de transcription [46]. Cependant, dans le plasmide pRiA4 de type agropine, le T-DNA est organisé dans deux fragments non contigus, les régions TL (à gauche) et la région TR (à droite), qui toutes les deux peuvent être transférées à la cellule végétale [47]. Le plasmide pRiA4 est devenu le plasmide de référence pour la nomenclature des différents *loci* présents sur le Ri-TL-DNA [47].

Pour le transfert de l'ADN à partir des bactéries vers la cellule végétale, trois blocs de familles de gènes sont nécessaires: le T-DNA, les gènes de virulence *vir* et les gènes chromosomiques de virulence (*chv*) [44]. Le TR-ADN contient des gènes pour la biosynthèse de l'auxine *aux1* et *aux2* ainsi que les gènes codant pour la synthèse de la mannopine (*mas1* et *mas2*) et les gènes de synthèse de l'agropine (*ags*) [44].

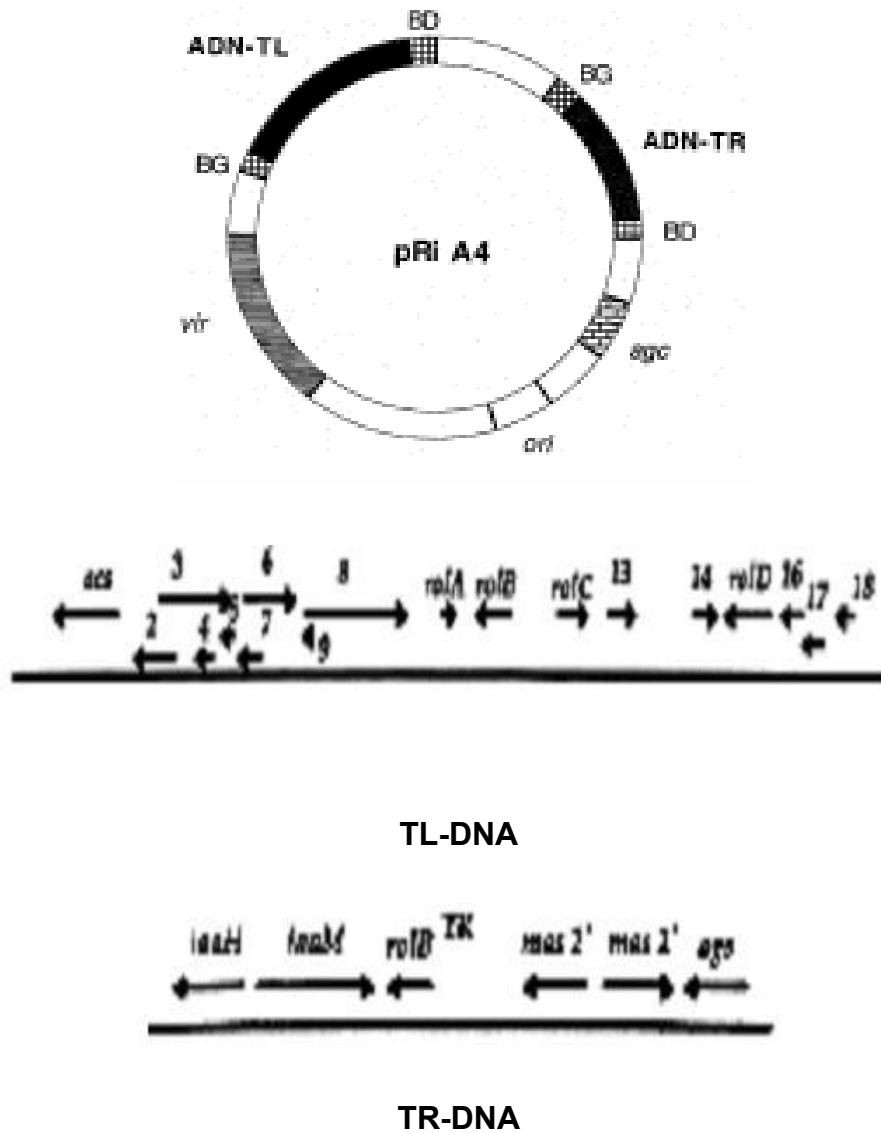


Figure 1.2 : Carte génétique du plasmide pRiA4 d'*A. rhizogenes* et organisation des deux fragments du T-DNA [44].

Le plasmide pRiA4 de la souche à agropine A4 d'*A. rhizogenes* possède deux fragments T-DNA de tailles différentes, une partie gauche (TL) et une partie droite (TR) qui sont transférées indépendamment. agc : gène de catabolisme de l'agropine ; BD : bordure droite ; BG : bordure gauche ; ori : origine de réplication ; vir région de virulence.

Les ORFs sont numérotées de 1 à 18 d'après leur ordre sur la séquence du plasmide.

Le TL-ADN héberge quatre types de gènes appelés oncogènes ou gènes *rol* ; *rol A*, *rol B*, *rol C* et *rol D*, auxquels étaient plus tard montrés correspondre à quatre des 18 'Open Reading Frames' (ORFs), identifiés par l'analyse du plasmide pRiA4 [44]. L'insertion a lieu dans seulement quatre lieux ORF10 (*rol A*), ORF11 (*rol B*), ORF12 (*rol C*) et ORF15 (*rol D*). Ces derniers affectent la morphologie des racines chevelues, alors que les autres ORFs semblent avoir un rôle additionnel dans la formation des symptômes de racines chevelues et en élargissant la gamme de l'infection.

### 1.2.3 Les fonctions des différentes régions du plasmide Ri

*Agrobacterium rhizogenes* comme *A. tumefaciens* provoque des changements morphologiques dans les tissus de la plante infectée et permet la croissance des tissus transformés *in vitro* en absence des régulateurs de croissance exogènes de la plante. Deux fonctions importantes ; la fonction de virulence et la fonction oncogène suivies par les fonctions de synthèse de phytohormones et de synthèse et catabolisme des opines.

#### 1.2.3.1 La fonction de virulence

La région *vir* couvrant 30,2 kb, est composée de 21 gènes rassemblant *virH1*, *virA*, *virB1-11*, *virG*, *virC1-2*, et *virD1-5*. L'organisation structurale des opérons *vir* du pRi1724 est exactement la même que celle des opérons *vir* des plasmides Ri ou Ti, bien que la taille de quelques ORF montre certaines variations parmi les plasmides [48, 49]. Le gène *virE3* dans le pRi1724 est différent de son homologue chez le plasmide Ti. Les gènes *virE1* et *virE2* sont aussi importants pour la virulence du pRi1724 [50].

Les protéines GALLS codées par le plasmide Ri [51] peuvent être remplacées par les protéines de virulence *VirE2* [52, 53] et *VirE1* [54, 55], lorsque ces derniers sont absents. Les gènes GALLS sont essentiels pour la virulence de la souche d'*A. rhizogenes* qui manquent de *VirE1* et *VirE2* [51].

L'expression de ces gènes est inductible par des composés phénoliques en particulier par ceux produits lors des réactions de défense mises en place par le végétal [56]. Pour résumer les fonctions assurées ; le groupe des gènes *vir* déterminent donc des protéines nécessaires à la perception de la blessure de la plante, au conditionnement et au transfert de l'ADN-T.

#### 1.2.3.2 Les oncogènes d'*Agrobacterium rhizogenes*

L'infection des plantes par la bactérie du sol *A. rhizogenes* à comme conséquence une maladie néoplastique avec formation de hairy root au niveau du site d'infection. L'expression de l'ensemble des oncogènes localisés sur le T-DNA intégré d'une manière stable, est responsable des symptômes de la maladie. Les symptômes du phénotype hairy root sont la cause simultanée de 4 loci localisés sur le TL-DNA d'un plasmide Ti de type agropine d'*A. rhizogenes*: *rolA*, *rolB*, *rolC* et *rolD* (root loci) et ORFs 10, 11, 12 et 15, respectivement [47, 44]. Les gènes *rol* ne montrent aucune homologie aux gènes du T-DNA d'*A. tumefaciens* [57].

Le gène ***rolA*** présent sur tous les plasmides Ri semble être lié au métabolisme de l'acide gibbérellique impliqué dans le développement de la plante. Son expression est cruciale pour l'établissement du phénotype "racines transformées" [57]. Chez *A. rhizogenes*, l'expression de *rolA* est maximale pendant la phase de croissance stationnaire, suggérant une survie fonctionnelle à long terme de la bactérie dans le sol, où elles sont le plus souvent en phase de croissance stationnaire à cause des éléments nutritifs limitants [58].

L'expression de ***rolB*** produit une protéine membranaire spécialisée dans la reconnaissance d'auxines qui modifie la réponse de la plante aux auxines. Ceci se traduit par un tissu racinaire plus dense que la normale. Le gène *rolB* est présent dans tous les plasmides Ri, avec une identité approximative de 60% entre les souches [57]. Des études ont montré que *rolB* était l'oncogène le plus important parce qu'une fois inactivé, la transformation avec les oncogènes restants échoue à produire le phénotype hairy root. Chez plusieurs espèces végétales étudiées, seul *rolB* est suffisant à induire la formation de racines chevelues ayant une croissance rapide, fortement ramifiées et non-géotropiques [59].



À l'origine démontré pour induire spécifiquement les racines, *rolB* est actuellement connu pour stimuler la formation de nouveaux méristèmes et ainsi décrit comme inducteur d'organogénèse, qui se différencie plus tard en organes spécifiques dépendant des concentrations locales d'hormones [59].

Comme *rolA*, ***rolC*** est impliqué dans le métabolisme de l'acide gibbérellique. Des données récentes proposent que *rolC* serait impliqué dans le métabolisme et le transport des sucres [60]. Les protéines *rolC* codées sur les divers plasmides Ri partagent plus de 65% d'identité d'acides aminés [57]. Les plantes transformées par *rolC* sont courtes, réduites dans les entre-nœuds [61, 62], montrent une dominance apicale réduite et des feuilles lancéolées. Elles produisent des inflorescences précoces avec de petites fleurs et une production faible de pollen. En outre, la production de racines est plus élevée par rapport aux plantes non transformées, mais faible par rapport aux plantes transformées par tous les gènes *rol* [63].

Le gène ***rolD*** n'est pas essentiel pour induire le phénotype des racines transformées, mais son absence retarde l'apparition des racines transformées [57]. À la différence des autres gènes *rol*, *rolD* est seulement trouvé dans le TL-DNA du plasmide Ri de type agropine. C'est également le seul gène *rol* qui est incapable d'induire seul la formation de racines [64]. Le phénotype principal de l'expression de *rolD* dans le tabac transformé est la floraison précoce et importante et la réduction de racines chevelues produites [64]. Ce phénotype est indépendant des hormones présentes dans les milieux de culture [59].

La séquence TL-DNA contient plusieurs ORFs transcrits autres que les gènes *rol* [44]. Lemcke et Schmülling [65] ont étudié certaines séquences de ces derniers qu'utilise la souche HRI d'*A. rhizogenes*. La séquence **ORF3n** dans le pRiHRI est légèrement plus longue que celle du pRiA4, elle a été désignée ORF3n. L'expression de 35S-ORF3n dans le tabac transgénique cause des altérations dans la longueur des entre-nœuds la morphologie et la croissance de la feuille. Le début de la floraison a été retardé et les inflorescences étaient moins denses que dans les plants non transformés. Les extrémités des feuilles supérieures, les sépales et les bractées deviennent nécrotiques.

La formation de pousses à partir des cals d'ORF3n a été empêchée sur un milieu contenant l'auxine et la cytokinine. Lemcke and Schmölling [65] ont suggéré qu'ORF3n puisse agir en supprimant la différenciation des tissus, qui peuvent favoriser la formation de racines par l'induction du gène *rol* à partir de telles cellules. La protéine d'ORF3n ressemble aux enzymes de modifications phénoliques et peut être impliquée dans le métabolisme secondaire et/ou le transport des hormones.

Le gène **ORF8** constitue la séquence la plus longue dans tout le gène TL-DNA [44], elle code pour une protéine contenant 780 acides aminés. Elle est également un des gènes les plus conservés, avec la similitude de séquences d'acides aminés de 81% entre le pRiA4 et le pRi2659 [66].

La tolérance des cellules des plantes aux auxines et aux cytokinines exogènes est plus élevée par l'ORF8. Les plants exprimant ORF8 peuvent se développer sur un milieu contenant des concentrations d'auxines qui empêchent complètement la croissance du type sauvage et des plants transgéniques d'*iaaM* [65]. La fonction de la protéine ORF8 n'a pas été déterminée, mais on suppose que les modifications de transport du saccharose peuvent être liées à l'induction du promoteur *rolC* par ce composé [66]. Il est également supposé que les taux élevés des sucres peuvent être bénéfiques à la bactérie et pourraient contribuer à la synthèse d'opines [67].

La séquence **ORF13** est très hautement conservée chez les plasmids Ri d'*Agrobacterium rhizogenes* de type agropine, mannopine, cucumopine et mikimopine. Le produit du gène est une protéine d'approximativement 200 acides aminés. La transformation seulement avec les gènes *rol* est insuffisante pour l'induction de hairy root dans les disques de carotte. La rhizogénèse est observée seulement avec la transformation simultanée des gènes TR-DNA *aux* ou d'ORFs 13 et 14 [68, 69].

Dans le tabac transgénique, si les différentes combinaisons de *rolB*, *rolC*, ORF13 et ORF14 ont été employées pour transformer les disques de feuilles, on a constaté que *rolB* et ORF13 induisent ensemble l'enracinement presque aussi

bien que le T-DNA complet [70]. Ces observations ont mené à l'hypothèse qu'ORF13 peut être impliqué dans la biosynthèse d'auxines. ORF13 est le seul gène du T-DNA du plasmide Ri qui induit la prolifération cellulaire.

Parmi les ORFs additionnels dans le TL-ADN, deux autres gènes qui peuvent également contribuer au phénotype du chevelu racinaire ; ORF1 et ORF14.

Le gène **ORF1** a été identifié quand le pRi8196 plasmide Ti de type mannopine a été séquencé [46]. Il est placé entre ORF13 et ORF14 sur le brin opposé. Plus court, homologue aux ORFs conservés dans la même région de pRiA4 de type agropine et au pRi2659 de type cucumopine. Ce gène est transcrit d'une manière spécifique chez les plantes dans les tissus vasculaires des feuilles [71].

Le gène **ORF14** a été prouvé agir d'une manière synergique avec les gènes *rol* et l'ORF13 pour améliorer l'induction racinaire dans la carotte et le tabac [69, 70].

#### 1.2.3.3 Synthèse de phytohormones (auxines et cytokinines)

Les gènes **ONC** sont responsables de la prolifération illimitée des cellules de la plante transformée, même en absence d'apport externe de phytohormones telles que les auxines et les cytokinines. Trois gènes ONC ont été identifiés, deux de ces gènes *AUX1* et *AUX2* codent pour des enzymes impliquées dans la production d'auxines [72], le troisième gène *CYT* est responsable de la synthèse de cytokinines [73, 74]. La proportion relative auxine/cytokinine a une grande influence sur la différenciation. Ainsi un taux élevé d'auxines conduit à la formation de racines tandis que le taux élevé de cytokinines mène à l'induction de la croissance de la partie aérienne.

#### 1.2.3.4 Synthèse et catabolisme des opines

Les gènes de synthèse des opines sont appelés gènes *ops*. Plusieurs d'entre eux ont été mis en évidence. Ils sont responsables de la synthèse de différentes opines ou famille d'opines. La région permettant le catabolisme des opines produites, appelée *opc*, représente, en taille, la plus grande partie des pRi, 'en accord' avec le rôle clef joué par ces molécules. Pour la quasi-totalité des opines, des gènes impliqués dans le catabolisme ont pu être identifiés : *moc* pour celui des mannityl opines, *acc* dans le cas des agrocinopines [75]. Pour être catabolisées, les opines doivent pénétrer dans les bactéries et des protéines spécifiques sont nécessaires à ce transport. La synthèse de ces molécules est codée par des gènes également portés par les pTi. Les opines induisent leur propre catabolisme via des protéines régulatrices qui, en leur présence, induisent l'expression des gènes de transport et de catabolisme.

Les opines sont donc ces composés produits de façon spécifique par la cellule végétale transformée. Les différentes opines connues (actuellement une vingtaine) sont groupées en familles selon leur structure chimique. Les principales familles d'opines sont : l'octopine, la nopaline, la mannopine, la leucinopine, la succinamopine (asparginopine) et l'agropine [76].

Les tissus de hairy root ont donc, tous, la caractéristique originale de présenter un métabolisme azoté particulier qui conduit à la production d'opines, celles-ci pouvant être dégradées par les agrobactéries. Cependant, et de façon remarquable, chaque agrobactérie pathogène n'est capable de cataboliser que le ou les seuls types d'opines dont elle a induit la synthèse chez la plante qu'elle infecte.

Cette spécificité est aussi à l'origine de la classification des plasmides Ri. Elle sert également de marqueur épidémiologique du fait de la spécificité qui existe aussi entre leur production dans les tissus tumoraux et le plasmide à l'origine [77].

### 1.3. *Agrobacterium rhizogenes* et la maladie du hairy root chez les arbres fruitiers à pépins

La maladie des racines chevelues se manifeste par des symptômes sous forme de racines organisées, beaucoup plus ramifiées que les racines normales. Le pathogène responsable de cette maladie est *A. rhizogenes*. La biologie de l'infection d'*A. rhizogenes* est très similaire à celle d'*A. tumefaciens* ; les souches virulentes contiennent un plasmide appelé *Root-inducing* (Ri) dont une partie est intégrée à l'ADN de la plante infectée. Les racines transformées sont capables de synthétiser un type d'opines métabolisé spécifiquement par le parasite.

#### 1.3.1 Caractéristiques du phénotype rhizogène

Les chevelus racinaires se manifestent par l'apparition d'un grand nombre de racines adventices, comportant de nombreux poils racinaires sur le lieu d'une blessure et notamment à la jonction des points de greffe (Figure 1.3). Contrairement à *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* présente un spectre d'hôte relativement étroit limité aux quelques espèces de Rosacées fruitières à pépins notamment les Pommoïdés ; le pommier, le poirier et le cognassier. Dès le début des années 1930, cette maladie a été décrite comme représentant un problème économique sur le pommier. En effet, C'est en 1930 que fut découvert *Agrobacterium rhizogenes* [78], alors que l'on pensait que la bactérie responsable des chevelus racinaires était la même que celle de la galle du collet.

L'auxine apparaît avoir un rôle très important dans la formation des chevelus racinaires. Ceux-ci se développent sur un milieu de culture en absence d'hormones, elles sont plus ramifiées que les racines normales et sont agéotropes, c'est-à-dire qu'elles ne prennent pas la direction du sol [79, 69]. Si la formation de la galle du collet semble résulter d'une augmentation de la concentration en auxines et en cytokinines dans la cellule végétale grâce aux gènes de synthèse du T-DNA, la formation des chevelus racinaires est beaucoup plus subtile et semble être due à une modification du système de réception-transduction du signal auxinique dans la cellule végétale.



Figure 1.3 : Symptômes de hairy root sur le pommier en conditions naturelles.

La formation des chevelus racinaires requiert non seulement de forts taux en auxines, mais également en saccharose, c'est pourquoi elle est initiée à partir des vaisseaux du phloème, qui contiennent de fortes concentrations de ces deux composés [80, 81].

Les chevelus racinaires sont formés uniquement de cellules transformées à l'inverse des tumeurs d'*Agrobacterium tumefaciens* et d'*Agrobacterium vitis* qui contiennent un mélange de cellules transformées et de cellules non transformées [82, 81]. Par conséquent les molécules qui ont entraîné leur formation ne sont pas diffusibles de cellule en cellule.

Une autre caractéristique du hairy root est la possibilité de régénérer des plantes à partir des chevelus racinaires [79, 83]. De telles plantes montrent un phénotype bien particulier; leur croissance est réduite, elles présentent une réduction de la dominance apicale et racinaire, ce qui entraîne leur aspect touffu, la formation de nombreuses racines adventives, des feuilles gaufrées et des fleurs plus petites, d'où une réduction de la production de pollen et de graines [83]. Les racines de ces plantes, cultivées *in vitro*, montrent un fort taux de croissance et une altération du géotropisme. Ces plantes transmettent leur phénotype à leur descendance et on retrouve la présence du T-DNA dans leurs graines [83].

La formation de racines adventives chez un certain nombre d'essences a été largement étudiée au niveau anatomique. Des études expérimentales ont été effectuées chez le cerisier [84], le noisetier [85], le sycomore [86], le poirier [87] et le pommier [88, 89, 90].

### 1.3.2 Mécanismes de l'infection

*A. tumefaciens* a été beaucoup plus étudié qu'*A. rhizogenes*. Aussi, les mécanismes cellulaires de transformation sont généralement décrits chez *A. tumefaciens*. Néanmoins, ces mécanismes restent semblables à ceux d'*A. rhizogenes*.

Le mécanisme de la transformation peut être dissocié en trois étapes :

- L'adhésion bactérie-plante constituant l'attraction et l'attachement de la bactérie à une cellule végétale blessée,
- L'activation des gènes de virulence *vir* ou étape de virulence déterminant l'excision et le transfert au génome végétal d'une portion de l'ADN du plasmide Ti (ADN de transfert nommé ADN-T ou T-DNA),
- Enfin, après intégration dans le génome végétal, l'expression par les cellules végétales des gènes du T-DNA.

#### 1.3.2.1 Attachement à la cellule végétale

Avant le transfert du T-DNA dans le génome de la cellule hôte, la bactérie reconnaît spécifiquement la cellule végétale et un contact physique s'établit alors entre elles. La reconnaissance entre *Agrobacterium* et la cellule de la plante est une étape très importante car l'inhibition de cette interaction provoque l'avirulence de la bactérie.

Les molécules de la cellule végétale reconnues par la bactérie sont localisées sur la paroi cellulaire et seraient apparentées à la vitronectine, protéine présente dans la matrice extracellulaire des animaux et connue pour servir de récepteur à plusieurs bactéries [91]. Ces protéines sont reconnues par un polysaccharide acylé dont la biosynthèse implique le locus *attR* du chromosome bactérien. L'interaction de ces deux molécules entraîne la synthèse de filaments de type cellulose qui renforcent l'attachement entre la bactérie et la cellule végétale. La stabilisation de la liaison bactérie/plante se fait grâce au locus *pscA* (ou *exoC*) et aux deux loci liés *chvA* et *chvB*, qui permettent la synthèse et l'excrétion de polysaccharides de type  $\beta$ -1-2 glucane, et aux fibrilles de cellulose impliquant le locus *cel* [92].

Les agrobactéries hébergeant un plasmide Ri ou un plasmide Ti doivent se trouver au voisinage des tissus végétaux pour réaliser le cycle infectieux. Elles



sont généralement stimulées par la présence de différentes plantes, en d'autres termes leur densité est accrue dans la rhizosphère, en comparaison à leur densité en sol nu. Cette stimulation nécessite au préalable que les agrobactéries soient capables de percevoir des signaux d'origine végétale tels ceux émis au niveau du site d'infection constitué par la blessure. La perception et la migration vers ces signaux sont étroitement liées [92]. Il s'agit là d'un des mécanismes que peut mettre en œuvre une bactérie pour répondre à un facteur de l'environnement, comme la présence de la plante.

#### 1.3.2.2 Activation des gènes *vir* et transfert du T-DNA

Les gènes *vir* sont impliqués dans le transfert du T-DNA et 4 loci (*virA*, *virB*, *virD* et *virG*) sont nécessaires au processus quelque soit l'hôte. Quant à *virE* et *virC*, ils sont importants pour l'infection de certaines espèces de plantes et permettent ainsi d'élargir le spectre d'hôtes d'*Agrobacterium*. Ces gènes sont extrêmement conservés d'une souche à l'autre et même d'une espèce à l'autre puisqu'il a été démontré que les gènes *vir* du plasmide Ri d'*A. rhizogenes* peuvent compléter ceux portés par le plasmide Ti d'*A. tumefaciens* [93]. Une telle similitude entre les deux espèces laisse présager d'un mécanisme d'infection identique.

Contrairement aux gènes de virulence chromosomiques, les gènes de virulence plasmidiques d'*Agrobacterium* ont besoin d'être induits par la plante pour être exprimés. En effet, les gènes *vir* sont induits par l'exsudat des cellules blessées riche en composés phénoliques appartenant à la famille des phénylpropanoïdes, comme l'acétosyringone et constituant un excellent inducteur. On peut également citer l'acide sinapinique, l'acide parahydroxybenzoïque ou encore la vanilline [94]. Ces composés sont reconnus avec l'aide des sucres par la protéine VirA, récepteur présent dans la membrane interne de la bactérie, qui possède une activité kinase et une activité phospho-transférase.

VirA semble également contenir des éléments importants dans la reconnaissance de l'hôte. La cascade de transduction du signal est alors déclenchée. Deux protéines codées par la région *vir* et exprimées, induisent après

activation la transcription des autres gènes *vir*, il s'agit de la protéine transmembranaire *virA* et de la protéine cytoplasmique *virG*. Leur activation dépend de plusieurs facteurs environnementaux : a) la sécrétion par les tissus végétaux blessés de composés phénoliques comme l'acétosyringone et de certains monosaccharides [56], b) le pH dont l'optimal d'induction se situe entre 5,0 et 5,8 [56], et, c) une température comprise entre 20 et 28°C qui permet une activation optimale des protéines constitutives. Au dessus de 37°C, l'inhibition est totale [95].

Pour résumer, les fonctions assurées par le groupe des gènes *vir* déterminent donc des protéines nécessaires à la perception de la blessure de la plante, au conditionnement et au transfert de l'ADN-T. Des activités analogues de *vir* notamment le transfert de facteurs de virulence, avec les autres systèmes de sécrétion de protéines dits systèmes de sécrétion de type IV ont été décrites chez d'autres genres bactériens Gram négatifs pathogènes tels que *Bartonella*, *Brucella* et *Legionella* [96].

### 1.3.2.3 Intégration du T-DNA et expression des gènes portés

A son entrée dans la cellule végétale, le brin T (T-DNA) est recouvert de la protéine *VirE2* qui protège l'ADN simple brin contre les nucléases de la cellule végétale en se fixant le long du brin T. Cette protéine est produite en grande quantité dans la bactérie et possède les propriétés classiques des protéines SSB ('Single Strand Binding'), c'est-à-dire qu'elle comporte un domaine de fixation à l'ADN simple brin et qu'elle est riche en acides aminés basiques [94, 32]. Elle semble entrer dans la cellule hôte indépendamment du brin T à travers le transporteur T constitué par les protéines *virB*. Le brin T comprend à présent le T-DNA sous forme simple brin avec la protéine *VirD2* à son extrémité 5' et est recouvert des protéines *VirE2*. La protéine *VirD2* guide ensuite le brin T dans la cellule végétale et sa séquence NLS 'Nuclear Localisation Signal' ainsi que celles des protéines *VirE2* permettent l'entrée du brin T à l'intérieur du noyau. En effet, la séquence NLS fait passer les protéines de plus de 50 KDa dans le noyau via les pores nucléaires avec l'aide de protéines appelées importines [32].

L'intégration du fragment dans le génome fait intervenir VirD2, qui coupe l'ADN de la plante, ainsi que des protéines cellulaires. Des recombinaisons illégitimes entraînent l'intégration du brin T et la synthèse du double brin a lieu grâce à des protéines de réparation et de réplication végétales [91]. Les lieux d'intégration ne montrent pas de séquences précises, au contraire de ceux des transposons. Toutefois, ils sont souvent localisés dans des zones transcrites car elles sont plus accessibles et sont riches en liaisons de type AT, ce qui permet une ouverture plus facile de l'ADN [32].

Les gènes portés par le T-DNA sont ensuite transcrits et traduits grâce à la machinerie cellulaire de l'hôte et leur régulation est fonction de leur propre promoteur.

Le T-DNA ainsi intégré porte un ensemble de gènes qui codent pour les enzymes qui contrôlent la biosynthèse des auxines et des cytokinines. La nouvelle balance hormonale induit la formation de proliférations racinaires nommé hairy root qui émergent du site de la blessure. Les tumeurs de hairy root sont distinguées par une prolifération massive de racines hébergeant fréquemment plusieurs poils racinaires adventives. L'agent pathogène change par conséquent le programme de différenciation des cellules de plantes pour créer un environnement propice et nutritif.

#### 1.4. Utilisation d'*Agrobacterium rhizogenes* et son plasmide Ri en biotechnologie végétale

Les deux espèces les plus connues et les plus utilisées en biotechnologie végétale sont *A. tumefaciens* et *Agrobacterium rhizogenes* qui sont des pathogènes pour de nombreuses plantes dicotylédones. Les recherches sur ces deux espèces concernant la compréhension des mécanismes de l'interaction bactérie/plante ont permis l'accumulation d'un nombre important de travaux.

De ce qui précède, on comprend que l'essentiel des travaux de recherche a porté sur la compréhension des mécanismes moléculaires de l'infection et du pouvoir pathogène. Ceci s'explique par l'intérêt biotechnologique du processus qui

a été exploité pour produire des plantes génétiquement modifiées pour des gènes d'intérêt comme ceux déterminants des résistances à des herbicides ou une résistance accrue à certains agents pathogènes.

L'utilisation d'*Agrobacterium rhizogenes* en biotechnologie a concerné trois aspects principaux: l'enracinement des espèces récalcitrantes, la production de métabolites secondaires et l'élimination de molécules toxiques des effluents industriels (phytoremédiation).

#### 1.4.1. Utilisation des propriétés rhizogènes pour l'enracinement des espèces récalcitrantes

La multiplication végétative est la méthode la plus importante utilisée commercialement pour la production de la majorité sinon de toutes les espèces ligneuses à travers le monde. L'enracinement est un préalable à la production réussie de plants viables. Cependant, dans le cas des plantes ligneuses, leur incapacité physiologique de produire les racines adventices a mené au besoin de greffage de beaucoup d'espèces.

Parmi les facteurs influençant la formation de racines adventices ; la récalcitrance qui est souvent considérée comme un facteur limitant l'utilisation de certains porte greffes. Beaucoup de cellules et tissus ne peuvent pas acquérir la compétence pour régénérer de nouveaux tissus et organes même quand les conditions sont optimales [97]. Les plantes qui ne peuvent pas régénérer avec facilité sont considérées comme récalcitrantes [98]. L'incapacité de maintenir la plasticité morphologique est typiquement associée aux cellules des plantes signifiant par conséquent que des plantes récalcitrantes ne peuvent pas être propagées avec succès. L'induction de racines adventices est une étape cruciale pour la micropropagation *in vitro* des espèces ligneuses pour lesquelles la capacité d'enracinement varie avec le génotype, et souvent, les génotypes d'intérêt agronomique sont récalcitrants pour la formation de racines.

Plusieurs auteurs ont rapporté un enracinement efficace en utilisant *Agrobacterium rhizogenes* par transformation des arbres fruitiers comme

l'amandier [5], le pommier [4], le kiwi [99], le noisetier [100], et les espèces ligneuses comme le genre *Pinus* [101, 102], le genre *Larix* [101], et l'*Eucalyptus* [103].

La transformation de micro-boutures et de jeunes plantes par *A. rhizogenes* semble être une excellente manière d'améliorer l'enracinement des plantes ligneuses et permettre enfin de réaliser un transfert efficace au champ.

D'autres travaux rapportent un succès de l'utilisation des gènes *rol* en floriculture en introduisant de nouveaux caractères aux plantes ornementales comme la couleur, la forme et le parfum [104].

#### 1.4.2. Utilisation des propriétés rhizogènes pour la production de métabolites secondaires

Le phénotype du hairy root est caractérisé par une croissance rapide, une ramification latérale, un géotropisme et une stabilité génétique. En raison de leur productivité élevée et stable, la culture du hairy root était étudiée pendant plusieurs décennies pour la production de métabolites de valeur qui sont présentes dans les racines sauvages à de faibles concentrations [105, 106]. Cette forte stabilité de l'élaboration des métabolites secondaires est un caractère intéressant dans la culture du hairy root.

Les plantes sont capables de produire de très nombreux métabolites secondaires qui sont classés selon leur structure chimique. A l'inverse des métabolites primaires, les métabolites secondaires ne sont pas synthétisés de manière uniforme dans le règne végétal. Un métabolite secondaire particulier est souvent spécifique à quelques espèces végétales. Trois grandes catégories de métabolites secondaires ont été définies: les composés phénoliques, les isoprénoides et les composés azotés. Environ 20 % des espèces de plantes produisent des alcaloïdes [107]. Les alcaloïdes ont en général une activité biologique et à ce titre, ils entrent dans la composition de nombreux médicaments comme principe actif. Les plantes les utilisent pour la plupart d'entre eux dans leur

système de défense contre les herbivores et les pathogènes car ces composés sont toxiques [108, 109].

Pendant 25 ans, le hairy root a été étudié comme étant un système biologique pour la production de composés de valeur à partir de plantes médicinales. Les racines chevelues sont également une source enrichissante de composés phytochimiques qui sont utiles comme produits pharmaceutiques ou cosmétiques, et comme additifs alimentaires. Ces racines ont la propriété également de synthétiser plus d'un métabolite simple [110].

Un certain nombre de plantes médicinales ont été transformées avec succès par *A. rhizogenes* et les racines chevelues induites ont montré une productivité relativement élevée des métabolites secondaires, pour un certain nombre de produits pharmaceutiques potentiellement importants. Sevon et Oksman-Caldentey [106] ont répertorié les alcaloïdes les plus importants produits par les racines chevelues, incluant *Atropa belladonna* L., *Catharanthus tricophyllus* L. et *Datura candida* L. [111].

#### 1.4.3 La phytoremédiation :

Les progrès récents ont permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le transfert du T-DNA dans les plantes [112] et l'intégration de nouveaux gènes dans le hairy root pour la synthèse des métabolites.

Le hairy root possède un potentiel énorme pour le processus de la phytoremédiation qui peut éliminer les contaminants des effluents industriels. L'exploitation de la capacité des espèces végétales à absorber et à accumuler les métaux lourds ou de convertir par voie enzymatique les molécules organiques toxiques en molécules inoffensives est appelée phytoremediation.

Les mécanismes fondamentaux de l'absorption, l'accumulation et la détoxification des produits toxiques par le hairy root sans interférence avec les autres organes ont été récemment étudiés [113]. Les racines de hairy root ont été

prouvées capables de dépolluer le sol et l'eau du Cadmium, du Nickel et de l'Uranium [114]. D'ailleurs, les racines chevelues de *Brassica juncea*, *Chicorium intybus*, *Helianthus annuus* et *Brassica napus* peuvent significativement détoxifier le pesticide DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane), les antibiotiques ; la tétracycline et l'oxytétracycline ainsi que le 2,4-dichlorophénol (2,4-DPC) des effluents industriels [113].

#### 1.4.4 Protocoles des systèmes de culture du hairy root

Pour réussir à établir un système de culture de hairy root de certaines espèces végétales, plusieurs conditions essentielles doivent être prises en considération, ces conditions incluent la souche bactérienne d'*A. rhizogenes*, un explant approprié, un antibiotique propre pour éliminer le surplus de bactéries après co-cultivation, et un milieu de culture adéquat.

Les souches d'*Agrobacterium rhizogenes* étudiées sont classées par rapport au type d'opine synthétisé et métabolisé. Habituellement cinq classes de souches peuvent produire le hairy root ; les souches à octopine, à agropine, à nopaline mannopine et à cucumopine [115]. La souche à plasmide Ti de type agropine comme la souche A4 est la souche la plus utilisée pour sa forte capacité d'induction [110].

Toutes les parties du végétal telles que l'hypocotyle, la feuille, la tige, le pédoncule, le pétiole, le bourgeon apical, le cotylédon, le protoplaste, la racine ou le tubercule, peuvent servir pour induire le hairy root [116]. Cependant, selon les différentes espèces, le matériel d'explant adéquat peut varier et l'âge du matériel est critique.

Pour induire le hairy root, les explants sont blessés séparément et co-cultivés ou inoculés par *A. rhizogenes*. L'explant est transféré après 2 à 3 jours dans un milieu solide avec l'antibiotique, tel que la céfotaxime pour éliminer le surplus des bactéries ayant servi pour la transformation [117]. Les hairy root sont induits généralement dans une courte période de temps qui varie entre une semaine et plus d'un mois en fonction des espèces végétales utilisées.

La composition optimale en éléments nutritifs pour la culture de hairy root est critique pour avoir une production importante de métabolites secondaires. Les facteurs comme la source de carbone, la concentration ionique dans le milieu, le pH du milieu, la luminosité, les phytohormones, la température et l'inoculum sont connus influencer la croissance du hairy root et par conséquent les concentrations de métabolites secondaires produits [118, 119].



## Chapitre II

### MATERIEL ET METHODES

La première partie de ce travail a été conçue pour nous permettre de déterminer la fréquence de la maladie du chevelu racinaire chez trois porte greffes de pommier ainsi que son influence sur la croissance. Dans la deuxième partie nous avons caractérisé une collection de souches d'*Agrobacterium* spp. appartenant au biovar 2 dans le but de déterminer celles présentant un pouvoir rhizogène. Un dernier aspect constituant une suite à la partie précédente a été traité dans le but d'étudier l'induction du hairy root chez le *Datura stramonium* var. *tatula*. Ceci constituera une contribution à l'étude du hairy root *in situ* et *in vitro*.

#### 2.1. Fréquence des symptômes du 'hairy root' dans quelques pépinières d'arbres fruitiers à pépins

La maladie du hairy root est connue comme étant une transformation du végétal par une bactérie du sol (*Agrobacterium rhizogenes*) pouvant apporter un effet synergique à la croissance de la plante transformée. Cette bactérie, permet une prolifération racinaire au niveau du site d'infection. Cette propriété a été longtemps recherchée dans le but de favoriser l'enracinement d'espèces récalcitrantes comme certains porte greffes de pommier [4], chez l'olivier [120] ainsi que des essences forestières comme le pin [101, 121, 122, 123, 102]

La partie consacrée à ce travail consiste à rechercher les symptômes du hairy root dans les pépinières d'élevage de différents porte greffes de pommier et d'évaluer la fréquence de ce phénotype sur la croissance de cultivars de pommiers assemblés à ces derniers.

### 2.1.1. Localisation des pépinières et données climatiques de la région d'étude

Notre zone d'étude se situe dans la région nord du pays. L'ensemble des enquêtes a été conduit dans les pépinières produisant des espèces de pommier. Un total de trois exploitations de pépinières produisant des plants de pommier pour la commercialisation a été concerné par nos prospections. Les pépinières sont localisées dans la région de Chebli CRAPPS (Coopérative Régionale Agricole de Production de Plants et de Services), la pépinière Rabia à Guerouaou et la pépinière Zitouni située à Soumâa. Ces trois pépinières sont localisées dans une région connue pour la production et la commercialisation de plants fruitiers, forestiers et ornementaux. La première est une exploitation étatique, les deux dernières appartiennent au privé.

- La pépinière de Chebli (CRAPPS)

Cette pépinière prend la dénomination de Coopérative Régionale Agricole de Production de Plants et de Services dont sa circonscription territoriale comprend les wilayates de Blida, Alger, Médéa, Tipaza, Boumerdés, Ain defla, Djelfa, Bouira, Tizi-Ouzou et Laghouat alors que le siège social de cette coopérative régionale agricole est établi dans la commune de Chebli, daïra de Bouinan wilaya de Blida. Elle a pour objectif d'assister ses adhérents à promouvoir et à réaliser les programmes de production de même qu'elle assure la coordination de l'écoulement des plants. Pour la réalisation de son objectif, elle est chargée de l'assistance technique et des services tel que l'élaboration du programme de mise en terre et assure la commercialisation de la production, l'organisation des actions de formation professionnelle et vulgarisation en vue de la génération des techniques de production et la participation à la recherche dans le cadre de la sélection et de l'amélioration des variétés ou cépages en collaboration avec les organismes et institutions concernées.

La pépinière est située à 25 km au nord de la wilaya de Blida. Elle est limitée au nord par la route nationale n° 61 (Chebli - Sidi Moussa), au sud par EAI Zahra Ahmed, à l'est par l'EAC n° 02 et à l'ouest par la CAPS. La pépinière est située dans la Mitidja.

La coopérative régionale été crée en 1985, d'une superficie totale de 36 ha. La superficie utilisée est de 30 ha, d'un type de sol argileux-limoneux. Les espèces produites sont : le pommier, les agrumes, le pêcher, le poirier, le prunier, l'amandier, l'abricotier, le pacanier, l'olivier, la vigne, le figuier, le cognassier et le grenadier. La production totale de la pépinière est estimée à 1.000.000 de plants par an. Pour la production de pommier, la coopérative comprend une marcottière d'une superficie de 2 ha.

- La pépinière Rabia (Guerouaou)

Cette pépinière située dans la région de la Mitidja, se trouve dans la commune de Boufarik, daïra de Boufarik wilaya de Blida ; elle est limitée au nord par une EAC, au sud par les terres agricoles, à l'est par une EAC et à l'ouest par la route nationale n° 11 (Alger – Blida).

Cette exploitation a été fondée en 1970 avec une superficie totale de 8 ha. La pépinière produit les espèces suivantes : le pommier, le prunier, les agrumes, l'olivier, le pêcher et le poirier, d'une production totale de 300.000 plant par an.

- La pépinière Zitouni (Soumaa)

La pépinière de Zitouni, fondée en 1970 est située dans la commune de Boufarik, daïra de Boufarik, wilaya de Blida. Elle est située également dans la région de la Mitidja, à 5 km du chef lieu de Blida. La pépinière couvre une superficie totale de 8 ha qui constituent la superficie agricole utile. La capacité de production est de 300 000 plants par an. La pépinière produit : le pommier, le prunier, les agrumes, l'olivier, le pêcher et le poirier.

### 2.1.2 Matériel végétal et échantillonnage

Les symptômes de la maladie du hairy root sont connus sur toutes les espèces de *Rosacées* fruitières à pépins (*Pomoidées*) comme le pommier, le poirier et le cognassier [124]. Pour cette étude, le choix du matériel végétal a porté

sur le pommier (*Malus domestica*) car cette espèce a la particularité de présenter une multitude de porte greffes qui sont disponibles pour des buts commerciaux.

### 2.1.3 Paramètres analysés du hairy root du pommier cultivé en pépinière

#### 2.1.3.1 Fréquence du chevelu racinaire

Le hairy root est une maladie présentant la particularité de croissances néoplasmiques sur des plantes infectées par des souches virulentes d'*Agrobacterium rhizogenes* vivant dans le sol et la rhizosphère. Par conséquent, les symptômes s'expriment au niveau de la partie souterraine. Vu la difficulté d'analyser la présence des symptômes au cours de la végétation, et afin de palier au fait de déterrer les plants, nous avons profité de la campagne d'arrachage des plants en vue de leur commercialisation pour effectuer nos observations.

Le hairy root est distingué par une prolifération massive de racines, hébergeant fréquemment de nombreux poils de racines adventices émanant de l'emplacement de l'infection. Nous avons par conséquent ciblé nos observations sur le système racinaire pour caractériser le chevelu racinaire.

Nos observations ont eu lieu au cours de la campagne d'arrachage des plants fruitiers qui s'est effectuée du mois de décembre à la fin mars 2007. Nous avons procédé à l'estimation de la fréquence de la maladie du hairy root sur des plants de pommier âgés d'un an après greffage et destinés à la commercialisation en évaluant la présence de la maladie chez trois types de porte greffes de pommier cultivés en pépinières.

La comparaison de plusieurs porte greffes pourrait apporter de plus amples informations au sujet de la fréquence des symptômes sur la partie racinaire chez cette espèce végétale. Les porte greffes étudiés sont : MM106, EM9 et MM111 associés à divers cultivars comme Royal gala, Starkrimson et Golden delicious (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Pépinières prospectées et porte greffes analysés.

Pépinière	Porte greffe	Variété
CRAPPS - Chebli	MM106	Royal gala
		Starkrimson
		Golden delicious
Rabia - Guerouaou	EM9	Golden delicious
Zitouni - Soumaa	MM111	Non greffée

La fréquence de la maladie du hairy root des différents génotypes cités précédemment a été calculée comme suit :

Fréquence du chevelu racinaire :

$$P_0 = \frac{\text{Nombre de plants atteints par le chevelu racinaire}}{\text{Nombre de plants total}} \times 100$$

Pour déterminer la fréquence du hairy root un échantillonnage systématique a été réalisé en analysant 10% des plants de toutes les parcelles choisies. Nous avons examiné visuellement les plants échantillonnés et nous avons considéré comme individu infecté tout plant présentant des symptômes typiques à la maladie du hairy root. Après l'arrachage de chaque lot de 10 plants, notre observation s'effectue sur le 11<sup>ème</sup> plant.

L'échantillonnage systématique consiste à considérer les facteurs suivants [125] :

1- Choisir l'effectif  $n$  de l'échantillon;

2- Calculer la raison  $p$  ( $p = \frac{N}{n}$ ); où

$N$  est l'effectif total de la population.

$n$  est l'effectif de l'échantillon.

3- Tirer au hasard un  $i^{\text{ème}}$  élément que l'on considérera comme le premier ;

4- Prélever un élément toutes les  $p$  unités.

La fréquence du hairy root a été étudiée sur un échantillon présentant une raison de 10% du nombre total des plants de pommier de chaque parcelle. Le pourcentage des plants présentant les symptômes typiques de hairy root a été calculé en l'assignant à un intervalle de confiance de 95%. L'intervalle de confiance a été calculé de la manière suivante [126] :

$$p_0 \pm 1,96 \sqrt{\frac{p_0 q_0}{n}} \quad \text{où}$$

$p_0$  : pourcentage observé des plants malades ;

$q_0$  : la proportion observée des plants malades ( $1 - p_0$ ) ;

**1,96** est la valeur de l'écart réduit correspondant à un risque de 5%.

### 2.1.3.2 Caractérisation de l'infection par le chevelu racinaire

Afin d'analyser plus finement la maladie du chevelu racinaire du pommier, nous avons mis en évidence quelques caractéristiques de l'infection sur les plants de la variété *Starkrimson* greffée sur le porte greffe MM106 issue de la pépinière de Chebli. Cette étude a été faite sur les plants présentant des symptômes

typiques de la maladie du hairy root en prenant en compte les paramètres suivants : le nombre moyen de sites rhizogènes, le nombre moyen de racines secondaires par site rhizogène et la longueur moyenne des racines secondaires (Figure 2.1) :

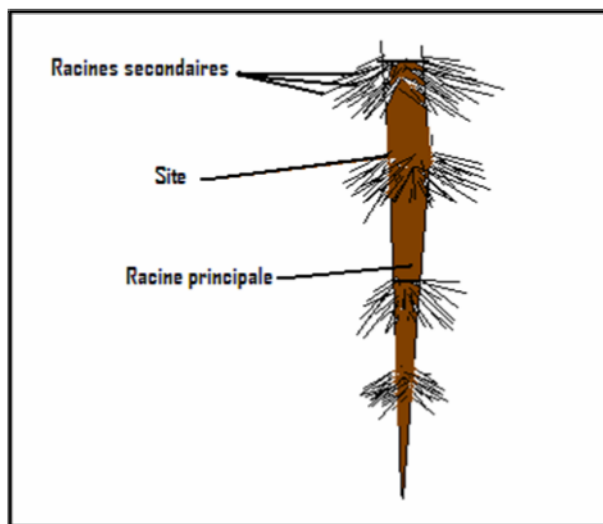


Figure 2.1 : Représentation schématique d'une racine avec 4 sites comportant plusieurs départs de racines chevelues.

### 2.1.3.3 Effet du hairy root sur la croissance

Un autre but recherché est l'évaluation de l'influence de la présence de racines chevelues sur la croissance des plants en fonction des porte greffes MM106 et EM9.

D'après la littérature, la maladie du hairy root présente une influence sur la croissance des plants. Nous avons estimé l'effet du hairy root sur certains caractères morpho-métriques des plants de pommier pour déterminer une éventuelle influence positive ou négative sur les plants élevés au stade de la pépinière.

Les paramètres retenus pour étudier l'effet du chevelu racinaire sur la croissance du pommier sont ; La taille de la tige principale par mesure de la hauteur de la tige principale et son diamètre pour des plants atteints (T) ou des plants non atteints (C) par le chevelu racinaire. La hauteur a été mesurée grâce à un mètre-ruban, le diamètre a été mesuré à une hauteur de 10 cm au dessus du sol. Ces paramètres ont été étudiés sur les plants constitués de deux (02) porte greffes : le porte greffe MM106 assemblé à la variété Golden delicious et le porte greffe EM9 associé à Golden delicious (Tableau 2.2). Pour chaque cas nous comparons les paramètres (hauteur et diamètre de la tige) à la fois chez les plants présentant des symptômes de hairy root (C) à des plants ne présentant pas de symptômes (T).

Tableau 2.2 : Porte greffes et variétés associés étudiés pour les paramètres de croissance.

Porte greffe	Variété	Nombre de plants
MM106	Golden delicious (T)	25
	Golden delicious (C)	25
EM9	Golden delicious (T)	25
	Golden delicious (C)	25

## 2.2. Sélection de souches d'*Agrobacterium* spp. rhizogènes

Le genre *Agrobacterium* regroupe des espèces tumorigènes, des espèces rhizogènes et des espèces non pathogènes. D'après les différentes taxonomies proposées pour ce genre, les bactéries produisant des racines chevelues ou 'hairy root' appartiennent à l'espèce *Agrobacterium rhizogenes* affiliées biochimiquement au biovar 2 ou au biovar 1 [19]. Dans la présente étude, nous avons recherché la



présence de souches rhizogènes parmi une collection d'agrobactéries appartenant au laboratoire de phytobactériologie isolées du sol et de la rhizosphère des plantes.

Il aurait été plus intéressant d'isoler les souches d'*Agrobacterium rhizogenes* à partir des plants porteurs de hairy root collectés suite à l'étude antérieure. Cependant, vu le temps que pourrait prendre l'isolement, la caractérisation biochimique et biologique des isolats, nous avons préféré utiliser des souches déjà identifiées et publiées [20, 127].

### 2.2.1. Souches d'*Agrobacterium* spp. étudiées

Les souches d'*Agrobacterium* spp. utilisées pour notre étude ont été isolées et identifiées par voie biochimique et moléculaire [20, 127]. Dans le but d'étudier la persistance et la survie du plasmide Ti chez des souches pathogènes dans des sols cultivés et non cultivés (jachère), les études précédentes menées par Krimi ont permis l'isolement de bactéries tumorigènes hébergeant le plasmide Ti mais également d'autres agrobactéries non tumorigènes. La population de bactéries choisies pour notre étude est constituée de 70 agrobactéries non tumorigènes et appartenant au biovar 2. La littérature rapporte que le biovar 2 regroupe des espèces rhizogènes appartenant à l'espèce (*Agrobacterium rhizogenes*) ou non pathogènes c'est-à-dire appartenant à l'espèce *Agrobacterium radiobacter* [128].

### 2.2.2 Etape d'enrichissement et de purification des souches

Les souches ont été conservées dans l'eau distillée stérile à la température du frigidaire (4°C). Afin d'activer la croissance de ces souches conservées pendant une période allant de 10 à 15 années, nous avons procédé à une étape d'enrichissement. Un millilitre de chaque suspension bactérienne est introduit dans des tubes contenant 4 ml de bouillon nutritif (LB). Les suspensions sont par la suite agitées sur un agitateur-secoueur pour permettre une meilleure oxygénation. Une étape d'incubation des souches à 27°- 28°C pendant 48 h est réalisée.

Après incubation les suspensions bactériennes, sont par la suiteensemencées par étalement sectoriel sur le milieu MG [129]. Les souches présentant les caractéristiques d'*Agrobacterium* spp. ; colonies arrondies, plus ou moins convexes (bombées), d'aspect plus ou moins gras, de couleur blanc à beige clair, de contour régulier [130] sont sélectionnées purifiées par étalements successifs jusqu'à obtention de clones purs.

### 2.2.3 Pouvoir pathogène des souches étudiées

Le pouvoir pathogène de chaque souche a été déterminé selon Moore et coll. [130], par inoculation de disques de carotte. L'utilisation de ce test nous permet de distinguer parmi les espèces appartenant au genre *Agrobacterium* : celles qui sont tumorigènes, rhizogènes ou non pathogènes.

Des tranches de carotte sont inoculées par dépôt d'une suspension dense ( $10^8$  bactéries/ml) sur l'anneau vasculaire, puis maintenues à la température du laboratoire dans des boites de pétri en verre contenant de la vermiculite. Chaque semaine la vermiculite servant comme substrat pour les disques de carotte est imbibée d'eau distillée stérile pour permettre de maintenir une certaine humidité dans les boites et empêcher le dessèchement des disques de carotte et par conséquent l'expression du pouvoir pathogène. Le développement des excroissances est noté 15 à 30 jours après l'inoculation.

### 2.2.4 Désinfection et inoculation des disques de carotte

Des racines tubérisées de carottes sont désinfectées pendant 1 heure dans 4% d'hypochlorite de calcium puis lavées 3 fois dans l'eau distillée pour éliminer l'excès d'hypochlorite de sodium. Les carottes sont épluchées et des rondelles sont découpées en repérant le pôle apical du pôle basal, afin de les orienter correctement dans la boite. Les rondelles sont par la suite déposées dans la boite de pétri selon une polarité inversée à raison de 5 à 6 disques par boite et par souche. Les cinq ou six disques constituent des répétitions.

### 2.2.5 Préparation de l'inoculum

Pour l'étape d'inoculation nous avons préparé des suspensions denses à une densité optique  $DO = 1$  et une absorbance  $A_{600nm}$ , ce qui correspond à une densité cellulaire de  $10^8$  bactéries/ ml [131]. A l'aide d'une micropipette, Un volume de 150  $\mu$ l est déposé sur la face supérieure des disques de carotte préalablement épluchées et désinfectées (Figure 2.2).

### 2.2.6 Lecture des résultats du pouvoir pathogène

La lecture des résultats du pouvoir pathogène sur les disques racinaires de carotte s'est faite 1 mois après l'inoculation. Une réponse positive se traduit par l'apparition de racines chevelues, une réponse négative se traduit par l'apparition de tumeurs et d'excroissances tissulaires ou bien par une absence totale de réponse. Les paramètres étudiés sont le nombre moyen de racines chevelues par souche, la longueur moyenne des racines et le diamètre des racines émises.

Les souches sont par la suite classées selon les moyennes et l'écart type de chaque paramètre cité précédemment.



Figure 2.2 : Préparation des disques de carotte pour l'inoculation.

### 2.3. Etude du pouvoir d'induction racinaire des souches d'*Agrobacterium* spp. sélectionnées

L'objectif de ce travail consiste à étudier la réponse du génotype *Datura stramonium* var *tatula* à l'induction de chevelus racinaires. Un total de 11 souches d'*Agrobacterium rhizogenes* sélectionnées par le test de carotte sur la base des paramètres cités précédemment. En plus des souches sélectionnées (11), nous avons utilisé, une souche de référence d'*Agrobacterium rhizogenes* (souche A4).

Cet aspect de recherche a été effectué au laboratoire d'Amélioration des Ressources Génétiques de l'INA dans le cadre du projet de recherche sur la production de métabolites secondaires (alcaloïdes) à partir du datura transformé par *A. rhizogenes*. Nous avons par conséquent utilisé le *Datura stramonium* var. *tatula* comme espèce végétale susceptible de produire des racines chevelues. Les souches rhizogènes étudiées sont : E<sub>32</sub>, PKR<sub>22</sub>, PKS<sub>411</sub>, PKS<sub>213</sub> H<sub>11</sub>, B<sub>32</sub>, PKS<sub>34</sub>, EKR<sub>414</sub>, F<sub>14</sub>, PKR<sub>23</sub> et C<sub>13</sub>. L'inoculation a été réalisée par dépôt des fragments de tiges dans des suspensions bactériennes préparées sur le milieu MS [132] et le milieu YEM [133] (Figure 2.3).

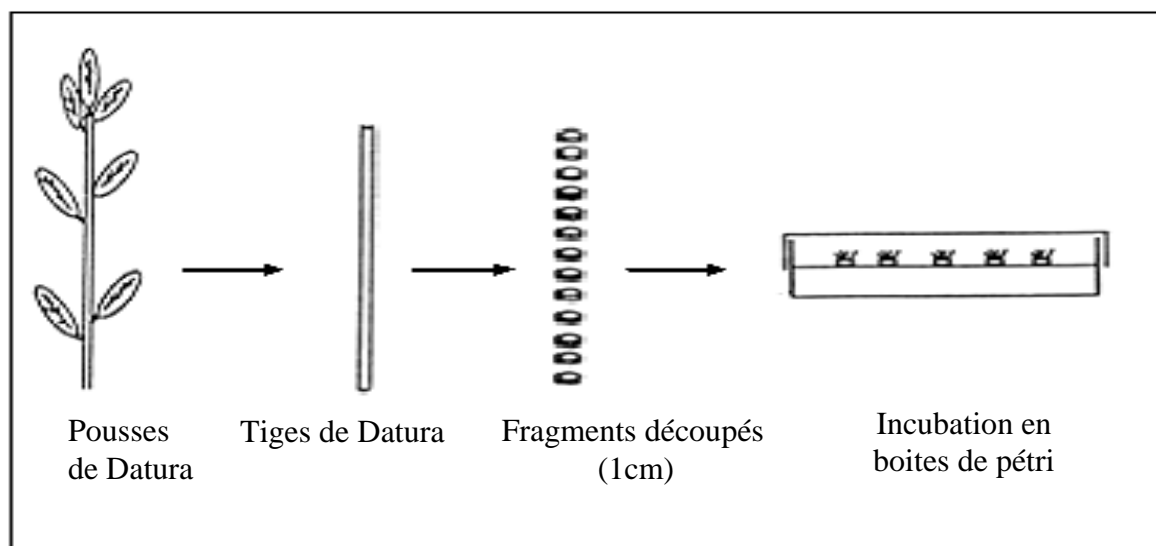


Figure 2.3 : Etapes de préparation des axes hypocotylés pour l'induction racinaire.

La réponse des explants de *Datura stramonium* au traitement, est estimée par la mesure des paramètres suivants : le taux de réactivité qui représente le pourcentage d'explants ayant formé un cal sur le site d'infection après 30 jours de la transformation. Le taux d'induction est le pourcentage d'explants ayant formé des racines après 30 jours de la transformation. Le temps moyen d'apparition de la première racine et le nombre moyen de racines par explant après 30 jours de la transformation sont également des paramètres pris en considération.

### 2.3.1. Matériel végétal, mise en culture et obtention des vitrosemis

Les vitrosemis sont utilisés pour prélever les hypocotyles destinées à la transformation.

Les vitrosemis sont obtenus par semis sur le milieu MS [132] de graines matures de population spontanées de *Datura stramonium* récoltées dans la Mitidja. Les graines de *datura* sont préalablement scarifiées à l'aide du papier verre (p80) selon la méthode de Slaoui et coll. [134]. Les graines scarifiées ont subi une désinfection qui consiste en : un passage dans l'éthanol à 70% pendant 30 secondes et un trempage dans le l'hypochlorite de sodium (eau de javel) à 12° pendant 10 minutes, suivi de trois rinçages à l'eau distillée stérile puis séchage sur papier filtre stérile.

Les graines sont ensemencées dans des tubes contenant 20ml de milieu MS, additionné de 7g/l d'agar et 20g/l de saccharose. Les tubes ainsi ensemencés sont placés dans une chambre de culture à une température de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  et une photopériode de 16h.

### 2.3.2. Souches bactériennes, activation, infection et coculture

Les souches d'*Agrobacterium* spp. rhizogènes et la souche de référence A4, sont cultivées à  $26^\circ\text{C} \pm 1$  dans l'obscurité sur le milieu gélosé YEM [133] pendant 72h. Chacune des douze souches est suspendue à part dans les milieux YEM liquide. Le même protocole adopté par Amdoun et coll. [135] a été utilisé pour infecter les fragments d'hypocotyles.

L'inoculation des axes hypocotyles est réalisée à la DO = 0,5 - 0,6 ( $\lambda = 600$  nm) correspondant à  $3,8 \times 10^5$  /  $2,0 \times 10^6$  CFU/ml [135]. Les explants (hypocotyles) de 1 cm de longueur âgés de deux mois sont infectés séparément par les suspensions bactériennes à l'aide de seringues. L'infection se fait par trappage au niveau de la section basale des fragments d'hypocotyles qui sont ensuite déposés, à raison de 4 explants par boîte de pétri, sur le milieu MS contenant 250mg/l de céfotaxime, selon une polarité inversée. Chaque traitement est répété 20 fois.

La co-culture bactérie- plante se fait à l'obscurité à  $26^\circ\text{C} \pm 1$  jusqu'à l'apparition des racines transformées.

### 2.3.3. Paramètres mesurés.

Les paramètres retenus pour étudier la virulence des bactéries sont :

- Le taux de réactivité (TR : pourcentage d'explants ayant formé un cal).
- Le taux d'induction des racines (TD : pourcentage d'explants ayant formé au moins une racine).
- Le temps d'apparition de la première racine (TPS).
- Le nombre de racines par explant (NR) durant 30 jours de culture.
- Le diamètre moyen des racines (DIA), mesuré après l'excision des racines de leur explant.

### 2.4. Traitements statistiques et analyse des résultats

L'analyse de la variance et le test de Newman & Keuls au seuil de 5% sont utilisés pour traiter les résultats obtenus. Il a été fait appel au logiciel STATGRAPHICS Centurien XV Version 12.2.05 copyright © 1982-2007 StatPoint, Inc. Pour l'exploitation des résultats nous avons utilisé un programme d'analyse

de la variance en model fixe à un seul facteur (porte greffes ou souches bactériennes), dont l'écriture est la suivante :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + E_{ij};$$

$$i = 1, \dots, I \text{ et } j = 1, \dots, n_i \quad \text{Où}$$

$i$  est le nombre de niveau du facteur  $\alpha$  ;

$n_i$  est le nombre d'observations à chaque niveau ;

$\mu$  = est la moyenne de la population ;  $\alpha_i$  sont les effets associées à chaque niveau du facteur  $\alpha$  ;

$E_{ij}$  sont des erreurs aléatoires indépendantes, distribuées selon une loi normale d'espérance mathématique égale à zéro et de variance homogène  $\sigma^2$ .

Le test de LSD (Least Significant Difference : 95,0 %) de Fisher est réalisé pour la comparaison des moyennes, dans le but de :

- Connaitre les caractéristiques morpho-métriques du hairy root des plants de pommier ;
- Comparer les plants de pommier chez les porte greffes atteints par le hairy root et ceux non porteurs de symptômes de hairy root en fonction des paramètres étudiés.
- Discriminer les souches bactériennes en fonction de chaque paramètre mesuré (classification monocaractère).

Dans le but de connaitre l'effet du hairy root sur la croissance des tiges de la variété Golden delicious greffée sur MM106 et EM9, les valeurs du diamètre ainsi que de longueur des tiges ont été tracés sous forme d'histogrammes groupés à l'aide du logiciel MICROSOFT® office Exel® 2007.

Concernant le classement multicaractères des douze souches bactériennes, en fonction de l'ensemble des paramètres, une classification ascendante hiérarchique (CAH) a été réalisée en utilisant le logiciel XLSTAT Pro7.5.2 copyright © 1995-2004 StatPoint, Inc. Cette analyse conduit à la construction d'un dendrogramme dont l'objectif est de constituer des groupes d'objets de manière à ce qu'ils soient les plus similaires possibles au sein d'un groupe.

Pour ce travail, le but est d'identifier les souches bactériennes ayant un comportement similaire vis-à-vis de l'induction des hairy root. La ressemblance est mesurée sur l'ensemble des variables descriptives qui sont au nombre de 5. Il existe un grand choix de mesures de ressemblances, lorsqu'il s'agit de variables quantitatives, la distance euclidienne est une mesure possible de la ressemblance.

Il existe aussi plusieurs méthodes d'agrégation (regroupement) des objets à classer. La méthode de Ward, aisée à mettre en œuvre lorsque la classification est effectuée après une analyse factorielle, constitue une très bonne méthode de classification ascendante hiérarchique sur données euclidiennes. Une Analyse en composantes principales (ACP) est donc effectuée avant l'établissement du dendrogramme, cette méthode d'analyse est utilisée pour résumer la structure des données décrites par plusieurs variables quantitatives. La matrice analysée est définie par 12 souches bactériennes et 05 paramètres quantitatifs.

Des calculs de corrélation ont été réalisés sur les moyennes des souches pour explorer les éventuelles liaisons entre les caractères étudiés.



## CHAPITRE III RESULTATS ET INTERPRETATION

### 3.1. Fréquence des symptômes du 'hairy root' dans quelques pépinières d'arbres fruitiers à pépins

#### 3.1.1. Fréquence du chevelu racinaire :

Dans les trois pépinières prospectées, nous avons remarqué la présence des symptômes caractéristiques du chevelu racinaire du pommier sur les porte greffes examinés. Les trois porte greffes présentent une prolifération massive de racines chevelues (Figure 3.1).

Une première estimation par porte greffe et par pépinière des plants atteints par le chevelu racinaire montre que la fréquence de cette infection est relativement importante (Tableau 3.1).

Le taux moyen se situe entre 14 à plus de 29 %. Cette dernière valeur concerne le porte greffe MM106 dans la pépinière de Chebli.

Tableau 3.1 : Estimation par porte greffe et par pépinière de la proportion de plants atteints par le hairy root.

Localisation	Porte greffe	Variété	Nombre de plants observés (n)	Nombre de plants atteints (m)	% de plants atteints (p <sub>0</sub> )	$p_0 \pm 1,96 \sqrt{\frac{p_0 q_0}{n}}$
Pépinière CRAPPS	M.M. 106	<i>Royal gala</i>	114	25	21,92	<b>0,2192 ± 0,076</b>
		<i>Starkrimson</i>	127	19	14,96	<b>0,1496 ± 0,062</b>
		<i>Golden delicious</i>	121	36	29,75	<b>0,2975 ± 0,081</b>
Pépinière Rabia	E.M.9	<i>Golden delicious</i>	109	25	22,93	<b>0,2293 ± 0,079</b>
Pépinière Zitouni	M.M.111	Non greffée	118	23	19,49	<b>0,1949 ± 0,071</b>



MM106



EM9



MM111

Figure 3.1 : Racines chevelues (hairy root) sur le système racinaire de trois porte greffes de pommier ; MM106, EM9 et MM111.

C : Plants avec symptômes de racines chevelues, T : plants sans symptômes de racines chevelues.

### 3.1.2. Caractérisation de l'infection par le chevelu racinaire

L'ensemble des porte greffe analysés (MM106, EM9 et MM111) manifestent des symptômes typiques de la maladie du chevelu racinaire (Figure 3.1). Cette dernière figure montre que le système racinaire des plants ne présentant pas de racines chevelues est moins développé que celui des plants pourvus de hairy root.

#### 3.1.2.1. Nombre de sites rhizogènes, nombre moyen et longueur moyenne des racines chevelues chez le MM106

Ce paramètre a été étudié chez le cultivar Starkrimson greffé sur le porte greffe MM106, par comparaison des plants chevelus (C) par rapport aux plants non chevelus (T). L'analyse de la variance de l'effet du hairy root sur le nombre de sites rhizogènes a révélé un effet significatif ( $F = 5,82$  ; ddl1/100 ;  $p = 0,0177$ ). D'après le test LSD, le nombre de sites rhizogènes chez les plants chevelus dépasse nettement celui trouvé chez les plants non chevelus (T). Pour cela le traitement MM106 Starkrimson (C) est classé dans le groupe **a** avec des valeurs de  $(6,64 \pm 1,49)$  alors que le traitement MM106 Starkrimson (T) est classé dans le groupe **b** avec des valeurs  $(5,57 \pm 1,53)$  (Figure 3.2).

Concernant le nombre moyen des racines du même porte greffe MM106, l'analyse de la variance a révélé un effet très hautement significatif ( $F = 187,92$  ; ddl1/100 ;  $p = 0,0000$ ). Avec la précision du test LSD, le traitement MM106 Starkrimson C est classé dans le groupe **a** avec des valeurs  $(60,14 \pm 6,74)$  alors que le traitement MM106 Starkrimson T est classé dans le groupe **b** avec des valeurs  $(24,36 \pm 9,36)$  (Figure 3.2).

Pour la longueur moyenne des racines, l'analyse de la variance a révélé un effet très hautement significatif ( $F = 99,92$  ; ddl1/100 ;  $p = 0,0000$ ). Le test LSD délimite deux agrégats le groupe **a** (MM106 Starkrimson C avec des valeurs de  $(10,85 \text{ cm} \pm 1,35)$  et le groupe **b** (MM106 Starkrimson T)  $(6,21 \text{ cm} \pm 4,65)$  (Figure 3.2).

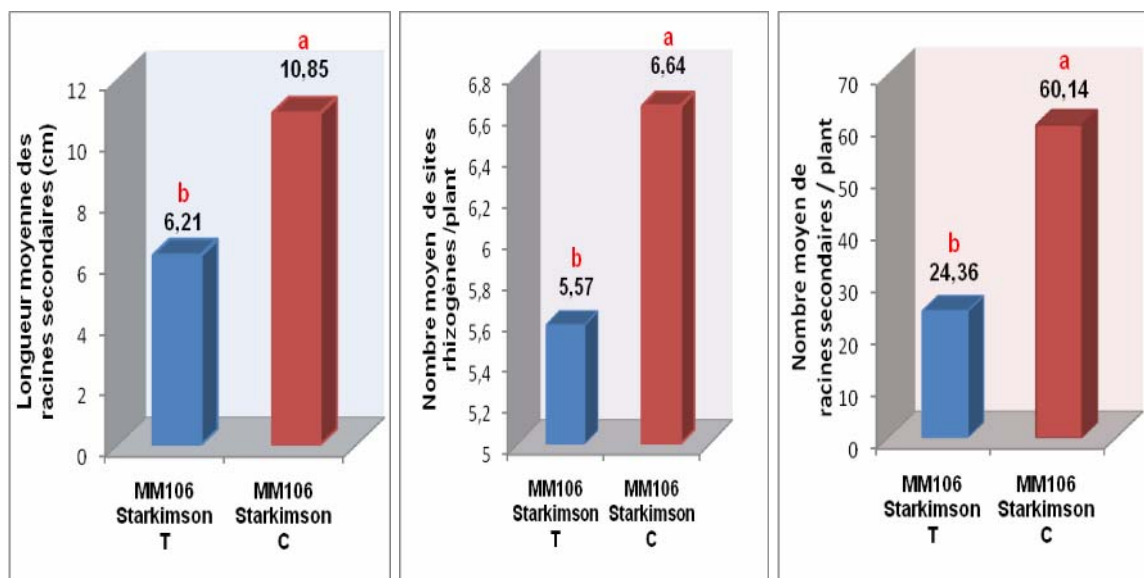


Figure 3.2 : Effet du hairy root sur le nombre moyen de sites rhizogènes, le nombre moyen de racines secondaires et la longueur des racines secondaires du porte greffe MM106.

C : plants avec symptômes de hairy root, T : plants sans symptômes de hairy root.

Ces résultats montrent que le système racinaire des plants atteints du porte greffe MM106 (C) portent un nombre plus élevé de sites rhizogènes et de racines secondaires ainsi que la longueur des racines est plus importante que ceux du porte greffe MM106 (T) des plants non atteints par le hairy root.

### 3.1.3 Effet du hairy root sur la croissance

L'analyse de la variance de l'effet du chevelu racinaire sur le diamètre des tiges principales de la variété Golden delicious greffée sur les deux porte greffes MM106 et EM9 a révélé un effet très hautement significatif ( $F = 11,66$  ;  $ddl3/96$  ;  $p = 0,0000$ ). Cependant, Le test de Fisher (LSD, 95 %) révèle trois groupes homogènes : **a** (MM106 *Golden delicious* C) avec des valeurs de ( $7,99 \text{ mm} \pm 1,87$ ), **b** (MM106 *Golden delicious* T) avec des valeurs de ( $7,10 \text{ mm} \pm 1,05$ ) et **c** (EM9 *G. delicious* C) avec des valeurs de ( $5,88 \text{ mm} \pm 1,18$ ). Cependant on observe un résultat intermédiaire entre le groupe **b** et **c**, il s'agit du porte greffe EM9 *Golden delicious* T avec des valeurs de ( $6,4 \text{ mm} \pm 1,05$ ) (Figure 3.3).

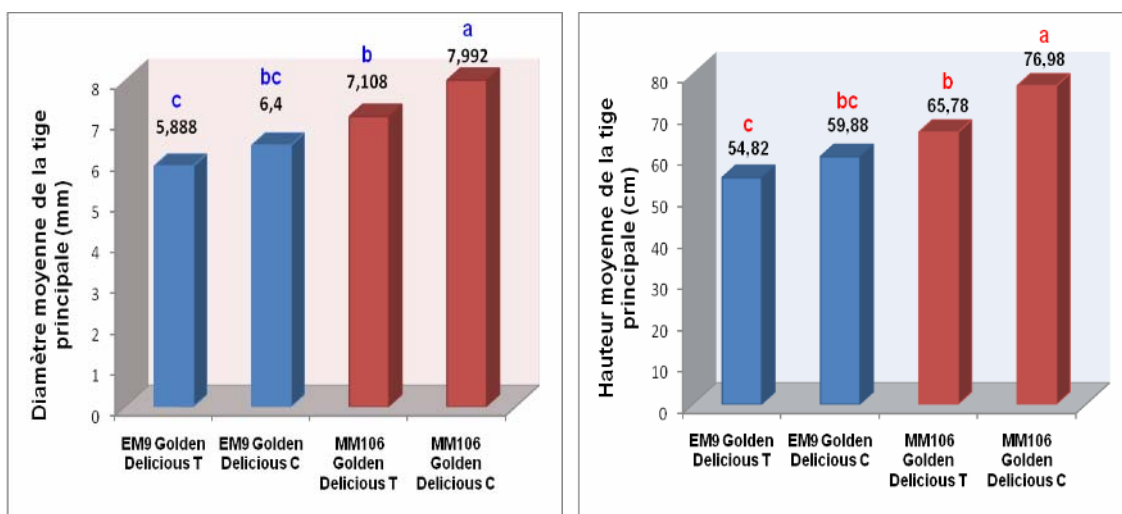


Figure 3.3 : Effet du hairy root sur la croissance des tiges de la variété Golden délicieux greffée sur MM106 et EM9.

C : plants avec symptômes de hairy root, T : plants sans symptômes de hairy root.

Ces résultats montrent que le chevelu racinaire a un effet positif sur le diamètre des tiges de la variété Golden délicieux greffée sur le porte greffe MM106 qui se traduit par la différence entre le groupe **a** (MM106 Golden délicieux C) et **b** (MM106 Golden délicieux T). De l'autre côté, on note qu'il n'y a pas d'effet sur le diamètre des greffons du porte greffe EM9 du moment que le groupe **c** (EM9 Golden délicieux T) et le groupe **bc** (EM9 Golden délicieux C) se chevauchent. Néanmoins, on ne remarque pas d'effet du porte greffe puisque le groupe **b** (MM106 Golden délicieux T) se chevauche avec le groupe **bc** (EM9 Golden délicieux T).

Concernant l'effet du chevelu racinaire sur la hauteur du cultivar Golden délicieux greffé sur les deux portes greffes MM106 et EM9, l'analyse de la variance a révélé un effet très hautement significatif ( $F = 19,14$  ; ddl 3/96 ;  $p = 0,0000$ ). Le test de Fisher (LSD, 95 %) révèle trois groupes homogènes : **a** (MM106 G. délicieux C) avec des valeurs de (76,98 cm  $\pm$  12,01), **b** (MM106 G. délicieux T) avec des valeurs de (65,78 cm  $\pm$  11,83) et **c** (EM9 G. délicieux T) avec des valeurs de (54,82 cm  $\pm$  4,84). Cependant on observe un résultat intermédiaire

entre le groupe **b** et **c**, il s'agit du porte greffe EM9 *G. delicious* C avec des valeurs de (59,88 cm  $\pm$  12,89) (Figure 3.3).

D'après ces résultats, le hairy root à aussi manifesté un effet positif sur la hauteur de la tige principale des plants de la variété Golden delicious greffée sur le porte greffe MM106 qui se traduit par la différence entre le groupe **a** (MM106 *Golden delicious* C) et **b** (MM106 *Golden delicious* T). Par contre, les plants de la variété *Golden delicious* greffés sur le porte greffe EM9 n'ont pas subi un effet sur leur tige principale qui est indiqué par l'absence de différence entre le groupe **c** (EM9 *Golden delicious* T) et le groupe **bc** (EM9 *Golden delicious* C) du moment qu'ils se chevauchent.

Cependant, ces résultats montrent que le porte greffe MM106 est plus affecté que le porte greffe EM9, ceci pourrait être expliqué par le fait que le système racinaire 'hairy root' du porte greffe MM106 a amélioré l'alimentation hydrominérale qui se traduit par une augmentation du diamètre significative d'environ 12 % et de la longueur de la tige principale de 17%.

### 3.2. Pouvoir rhizogène des souches d'*Agrobacterium* spp.

Après un mois de culture *in vitro* des disques de carotte dans les boîtes de pétri, les résultats sont observés et enregistrés. Sur les 70 souches, 42 sont rhizogènes et 28 sont non rhizogènes, ils ont formé seulement des cals comparant aux disques témoins traités par de l'eau distillée stérile. La souche D151 s'est révélée tumorigène, la réponse s'est traduite par la formation d'une tumeur (Figure 3.4).

Après 15 jours d'inoculation, tous les disques de carottes ont manifesté un cal au niveau du site d'infection, y compris les disques témoins inoculés avec l'eau distillée stérile.



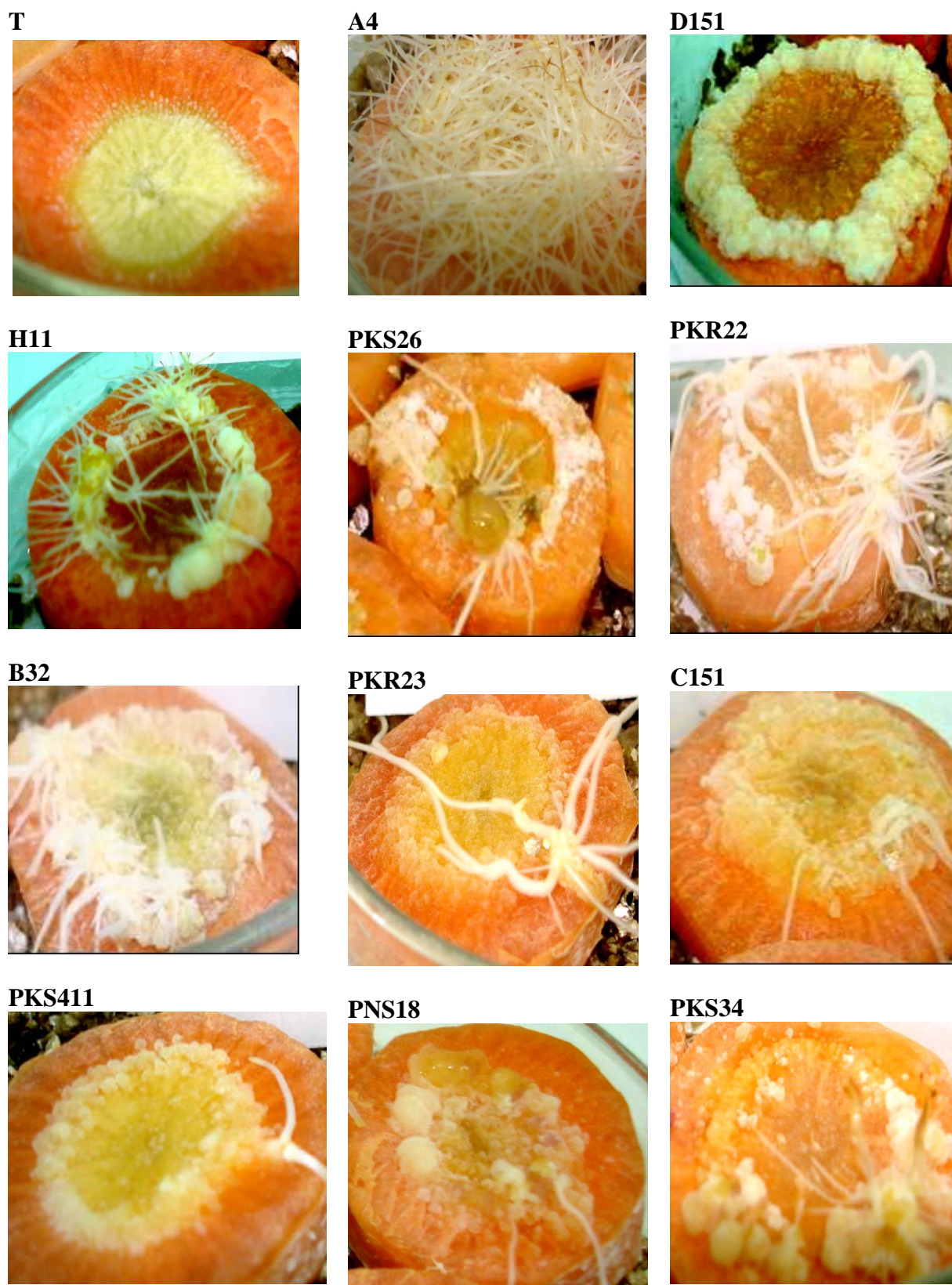


Figure 3.4 : Pouvoir pathogène (rhizogène) des souches testées sur disques de carotte.

**T** : Témoin négatif, inoculation avec eau distillée stérile. **A4** : souche d'*Agrobacterium rhizogenes* de référence (rhizogène). **D151** : souche d'*Agrobacterium tumefaciens* (tumorigène).

Les symptômes observés, cals ou racines sont situés surtout au niveau du cambium qui est constitué de cellules indifférenciées, en division qui sont les cellules cibles d'*Agrobacterium rhizogenes*.

Trois types de réponses à l'inoculation ont été observés : 27 souches ont provoqué la formation seulement de cals, alors que les 42 autres souches ont provoqué la formation de cals et de racines et 1 souche a provoqué la formation d'une tumeur.

Une variabilité dans le nombre ainsi que la longueur et le diamètre des racines émergeantes de disques de carotte était observée (Figure 3.5).

La figure 3.5. montre le nombre, la longueur et le diamètre des racines induites par quelques souches d'*Agrobacterium* spp. appartenant au biovar 2. Selon le nombre et le diamètre des racines formées nous avons pu sélectionner 12 souches les plus virulentes. On n'a pas pris en considération le paramètre longueur des racines car les écarts types sont très élevés. Ceci peut être expliqué par le fait que certaines souches forment des racines très longues alors que d'autres forment des racines très courtes.

Les souches **PKS<sub>411</sub>**, **PKR<sub>23</sub>**, **E<sub>32</sub>**, **H<sub>11</sub>**, **C<sub>13</sub>**, **B<sub>32</sub>**, **PKS<sub>34</sub>**, **PKR<sub>22</sub>**, **EKR<sub>414</sub>**, **F<sub>14</sub>**, **PKS<sub>213</sub>** et la souche de référence A4, présentent les meilleurs réponses concernant les paramètres analysés du pouvoir rhizogène. Ces derniers ont été sélectionnés pour les tests ultérieurs.



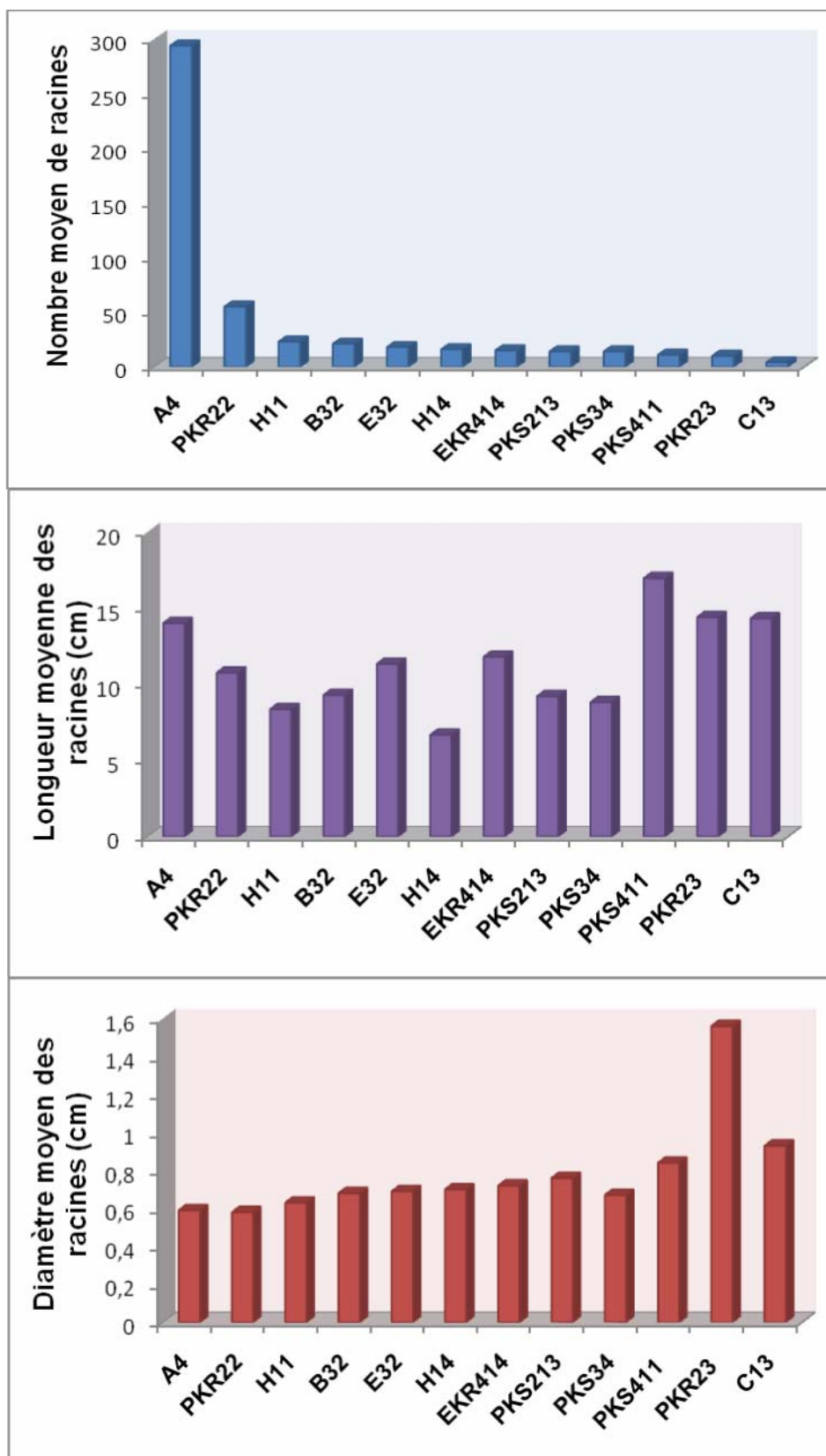


Figure 3.5 : Caractérisation du pouvoir rhizogène des souches d'*Agrobacterium* spp. sélectionnées sur la base du nombre, la longueur et le diamètre moyens de racines chevelues produites sur les disques de carotte.

### 3.3. Pouvoir d'induction racinaire des souches d'*Agrobacterium* spp. sélectionnées, sur le *Datura*

#### 3.3.1. Classement monocaractères des souches bactériennes

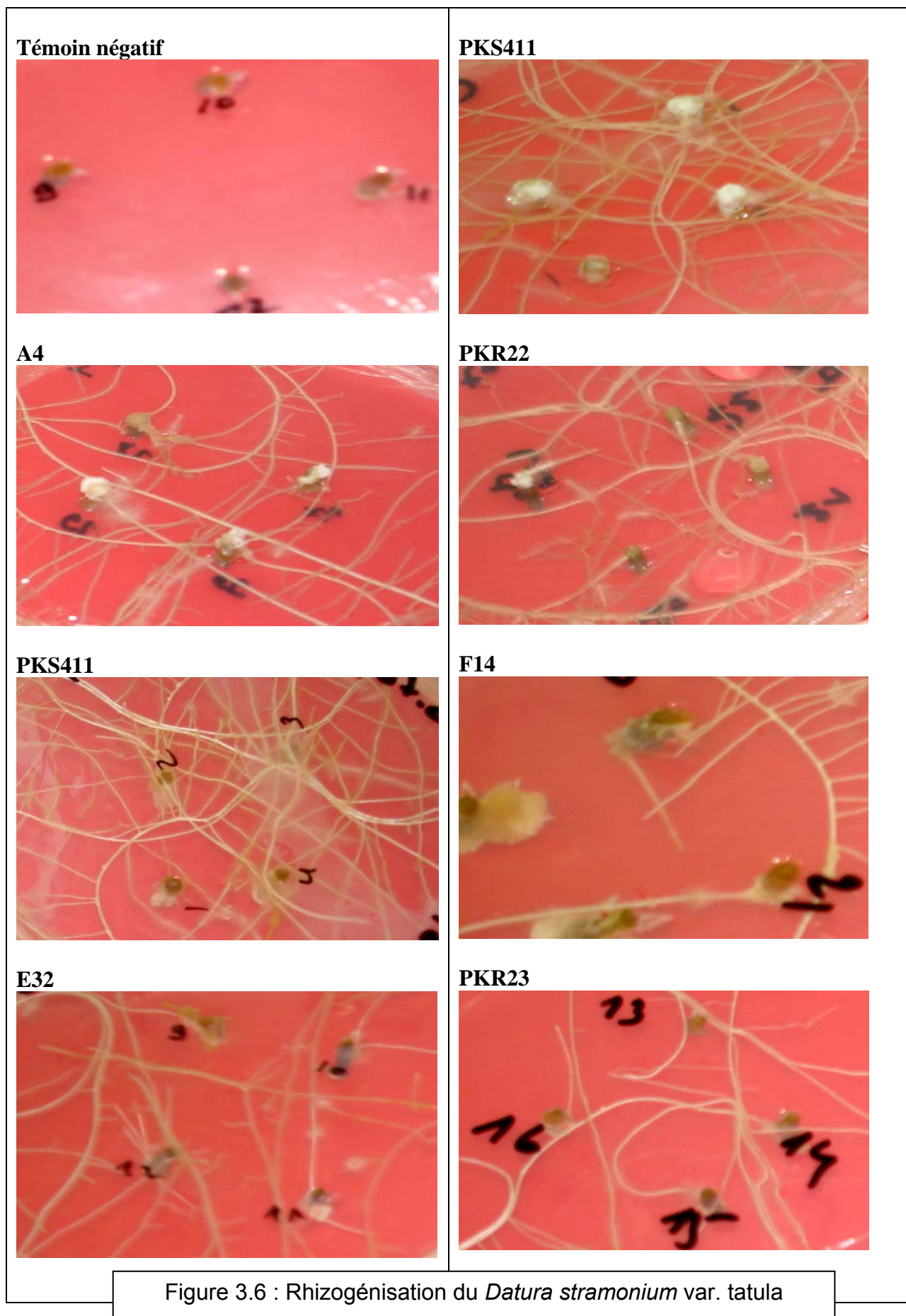
Au terme de notre expérimentation, le taux de germination des graines de *Datura stramonium* var. *tatula* était de 80,48 %. Seules les racines émergentes du site d'infection sont comptabilisées.

Le taux de réactivité est de 100 % pour l'ensemble des souches testées. Après 5 à 10 jours d'inoculation, des cals se forment au niveau du site d'infection à partir duquel émergent des racines (Figure 3.6).

L'analyse de la variance de l'effet des différentes souches bactériennes sur le taux d'induction des racines révèle un effet très hautement significatif ( $F = 3,79$  ;  $ddl_{11/228}$  ;  $p = 0,0001$ ) (Tableau 1). D'après le test LSD, on peut distinguer trois agrégats de souches (Tableau 3.2) : le premier va de la souche  $EKR_{414}$  (20 %) à la souche  $C_{13}$  (40 %), le deuxième de la souche  $F_{14}$  (50 %) à  $PKR_{22}$  (70 %) et le dernier de la souche  $PKS_{411}$  (80 %) à la souche  $A_4$  (85 %).

Concernant le temps d'apparition des racines, l'analyse de la variance de l'effet des différentes souches bactériennes ne révèle pas d'effet significatif ( $F = 1,27$  ;  $ddl_{11/36}$  ;  $p = 0,2795$ ). De même, Le test LSD ne révèle pas d'agrégats significatifs des souches (Tableau 3.2).

Pour le nombre de racines induites par explant, l'analyse de la variance ne révèle pas d'effet significatif ( $F = 1,59$  ;  $ddl_{11/118}$  ;  $p = 0,1109$ ). Néanmoins le test LSD délimite deux agrégats : le premier va de la souche  $C_{13}$  ( $1,00 \pm 0,00$ ) à la souche  $A_4$  ( $1,5 \pm 0,98$ ) et le deuxième de la souche  $E_{32}$  ( $1,8 \pm 1,25$ ) à  $EKR_{414}$  ( $2,75 \pm 2,87$ ).



L'analyse de la variance de l'effet des différentes souches bactériennes sur le diamètre des racines induites révèle un effet hautement significatif ( $F = 2,29$  ;  $ddl_{11/171}$  ;  $p = 0,0121$ ) (Tableau 3.2). D'après le test LSD, nous pouvons distinguer deux agrégats : le premier comprend la souche  $E_{32}$  ( $0,635 \text{ cm} \pm 0,31$ ) jusqu'à la souche  $C_{13}$  ( $0,775 \text{ cm} \pm 0,25$ ) et le deuxième de la souche  $PKR_{22}$  ( $0,78 \text{ cm} \pm 0,19$ ) à la souche  $F_{14}$  ( $0,92 \text{ cm} \pm 0,18$ ).

D'un point de vue phénotypique, les racines diffèrent selon la souche utilisée. Le tableau 3.2, résume les résultats correspondants.

Tableau 3.2 : Classement monocaractères des souches bactériennes d'*Agrobacterium rhizogenes* selon les paramètres analysés.

Taux d'induction (%)		Temps d'apparition des racines		Nombre de racines par explant		Diamètre	
EKR <sub>414</sub>	20	E <sub>32</sub>	8,00	C <sub>13</sub>	1,0	E <sub>32</sub>	0,63
B <sub>32</sub>	35	PKR <sub>22</sub>	8,50	PKR <sub>23</sub>	1,16	H <sub>11</sub>	0,70
C <sub>13</sub>	40	A <sub>4</sub>	9,25	F <sub>14</sub>	1,20	PKS <sub>411</sub>	0,72
F <sub>14</sub>	50	PKS <sub>411</sub>	9,50	PKS <sub>213</sub>	1,25	A <sub>4</sub>	0,74
PKS <sub>34</sub>	55	PKS <sub>213</sub>	10,50	PKR <sub>22</sub>	1,30	B <sub>32</sub>	0,74
H <sub>11</sub>	55	H <sub>11</sub>	11,25	B <sub>32</sub>	1,42	C <sub>13</sub>	0,77
E <sub>32</sub>	55	B <sub>32</sub>	12,00	H <sub>11</sub>	1,44	PKR <sub>22</sub>	0,78
PKR <sub>23</sub>	65	PKS <sub>34</sub>	12,25	PKS <sub>34</sub>	1,44	PKS <sub>213</sub>	0,79
PKR <sub>22</sub>	70	EKR <sub>414</sub>	12,75	PKS <sub>411</sub>	1,53	EKR <sub>414</sub>	0,84
PKS <sub>411</sub>	80	C <sub>13</sub>	12,71	A <sub>4</sub>	1,55	PKS <sub>34</sub>	0,84
PKS <sub>213</sub>	85	F <sub>14</sub>	13,00	E <sub>32</sub>	1,81	PKR <sub>23</sub>	0,87
A <sub>4</sub>	85	PKR <sub>23</sub>	13,25	EKR <sub>414</sub>	2,75	F <sub>14</sub>	0,92

(LSD 95,0 % ; Les moyennes non significativement différentes sont réunies par la même barre verticale).

### 3.3.2. Corrélation entre paramètres

La matrice des corrélations entre les paramètres mesurés est présentée dans le tableau 3.3. D'après ce dernier, on remarque que les paramètres ; taux d'induction et temps d'apparition des racines présentent une corrélation

significativement négative (- 0,57) et que le diamètre des racines et le temps d'apparition des racines sont corrélés positivement (0,56).

Tableau 3.3 : Matrice de corrélation des souches étudiées selon les paramètres mesurés.

Taux d'induction (TD)	(TD)		
Temps d'apparition des racines (TPS)	<b>- 0,575*</b>	(TPS)	
Nombre de racines par explant (NR)	-0,439	-0,206	(NR)
Diamètre des racines induites (DIA)	-0,195	<b>0,565*</b>	-0,104 (DIA)

\* : Valeurs significatives à un niveau  $\alpha = 5 \%$

**TD** : taux d'induction des racines ; **TPS** : temps d'apparition des racines ;  
**NR** : nombre de racines ; **DIA** : diamètre des racines.

### 3.3.3. Analyse en composantes principales (ACP)

Avant l'établissement du plan de l'ACP, on doit procéder à l'analyse des axes. Les axes présentant les plus fortes valeurs (valeurs propres, taux de variance) seront retenus. Avec des valeurs propres de 1,912 et 1,354 pour respectivement F1 et F2, ces axes expliquent 82 % de la variabilité (Tableau 3.4). Ces deux axes sont donc retenus pour l'établissement du plan de la figure 3.7.

Tableau 3.4. Valeurs propres et taux de variance des 04 axes.

	F1	F2	F3	F4
<b>valeurs propres</b>	1,912	1,354	0,601	0,133
<b>variance %</b>	47,794	33,860	15,033	3,313

## Variables et observations (axes F1 and F2: 82 %)

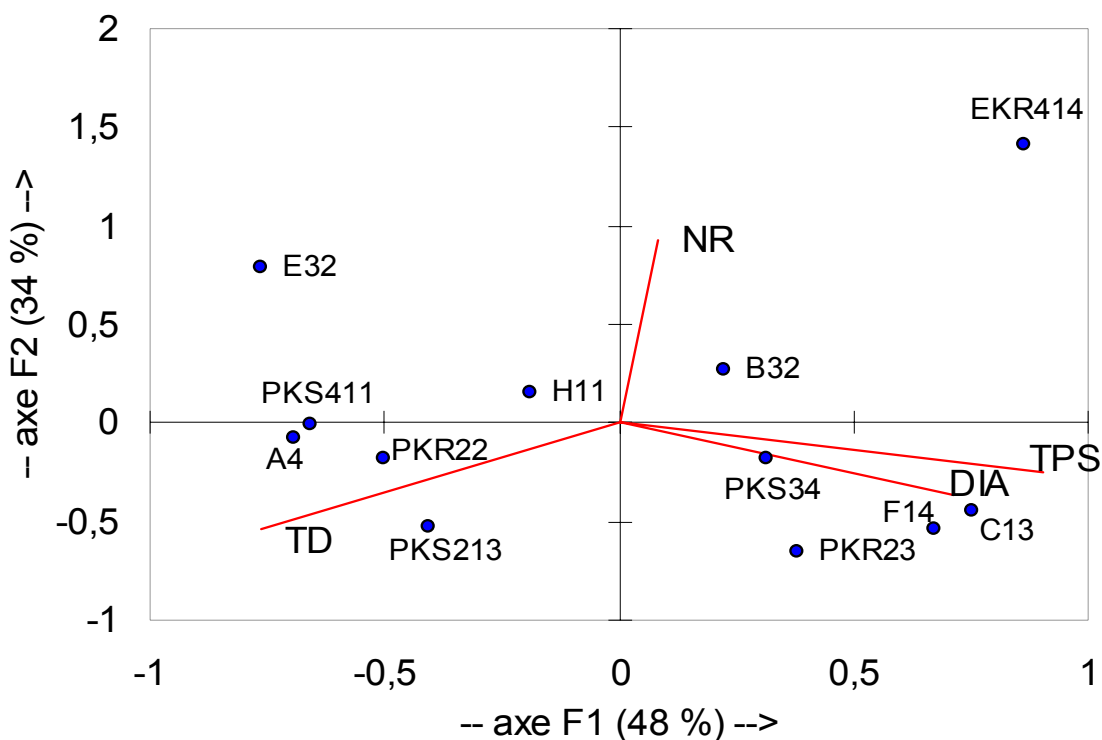


Figure 3.7 : Analyse en composantes principales (ACP) des souches bactériennes selon les paramètres étudiés.

**TD** : taux d'induction, **NR** : nombre de racines, **TPS** : temps d'apparition des racines, **DIA** : diamètre des racines.

L'axe 1 explique 48 % de la variation, il associe du côté positif les paramètres temps d'apparition des racines, diamètre des racines et du côté négatif le taux d'induction. L'axe 2 explique 34 % de la variation, il est défini du côté positif par le nombre de racines.

D'après la figure 3.7, il se dégage trois ensembles : Le premier ensemble est représenté par les souches EKR<sub>414</sub> et B32 positionnées dans la partie positive de l'axe 1. Le deuxième ensemble est le plus important avec 5 souches bactériennes : H<sub>11</sub>, E<sub>32</sub>, PKS<sub>411</sub>, PKR<sub>22</sub>, PKS<sub>213</sub> et la souche de référence A<sub>4</sub>. Le dernier ensemble est constitué des souches ; PKS<sub>34</sub>, F<sub>14</sub>, C<sub>13</sub> et PKR<sub>23</sub>.

La dispersion des points moyens des souches bactériennes sur le plan de la figure 3.7, montre suivant l'axe 1, l'individualisation de la souche EKR<sub>414</sub> du fait, probablement, des faibles valeurs que prend son taux d'induction.

Selon l'axe 1, les souches bactériennes se répartissent en deux groupes dont l'un est du côté positif et l'autre du côté négatif. Les souches corrélées au côté positif : EKR<sub>414</sub>, B<sub>32</sub>, PKS<sub>34</sub>, F<sub>14</sub>, C<sub>13</sub> et PKR<sub>23</sub> ce caractérisent par un nombre de racines, le diamètre et le temps d'apparition des racines en général important et un faible taux d'induction. Du côté négatif on retrouve les souches : E<sub>32</sub>, H<sub>11</sub>, PKS<sub>411</sub>, A<sub>4</sub>, PKR<sub>22</sub> et PKS<sub>213</sub> qui présentent surtout un taux d'induction élevé.

#### 3.3.4. Classification Hiérarchique

L'ACP est complétée par une classification hiérarchique des différentes souches bactériennes. Le classement est présenté sous la forme d'un dendrogramme basé sur une échelle des distances euclidiennes. L'agrégation est faite selon la méthode de Ward (Figure 3.8). On peut envisager, selon la figure 3.8, quatre classes en déca de la distance 7. Les classes sont des groupes constitués des observations qui ont des caractéristiques similaires.

Selon la figure 3.8, la première classe est formée par les souches A<sub>4</sub>, PKS<sub>411</sub>, PKR<sub>22</sub>, PKS<sub>213</sub>. On retrouve les plus faibles distances pour les souches A<sub>4</sub> et PKS<sub>411</sub> qui sont très semblables. La deuxième est formée par la souche B<sub>32</sub>, H<sub>11</sub> et E<sub>32</sub>. La troisième classe est constituée par les souches PKR<sub>23</sub>, PKS<sub>34</sub>, F<sub>14</sub> et C<sub>13</sub>. Vu sa distance importante, la souche EKR<sub>414</sub> est très individualisée et forme la dernière classe.

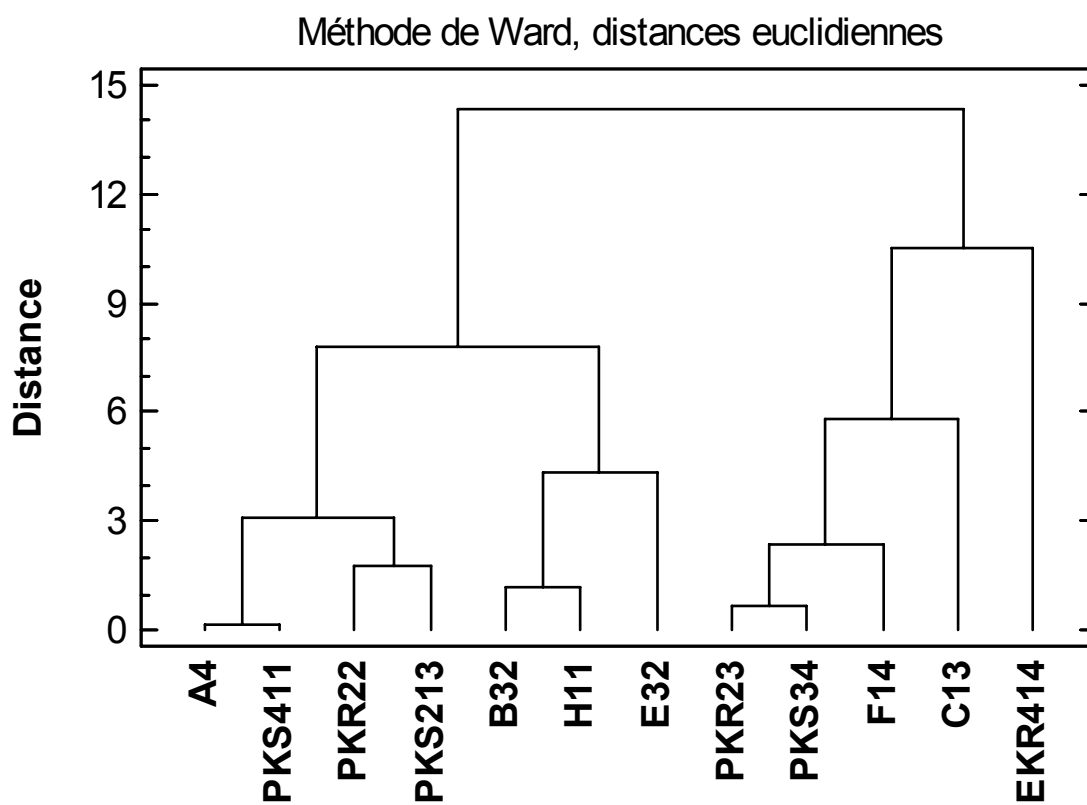


Figure 3.8 : Dendrogramme des douze souches bactériennes étudiées

D'après les distances euclidiennes, les objets sont regroupés selon la méthode de Ward.



## IV. DISCUSSION GENERALE

### 4.1 Le hairy root *in situ* : Influence positive sur l'enracinement et sur la croissance

Les prospections effectuées au niveau des trois pépinières ; Chebli, Boufarik et Soumaa nous ont permis d'estimer le taux des plants porteurs de symptômes de hairy root et de déterminer son effet sur la croissance des tiges principales des plants du pommier. Le hairy root a été observé sur des plants greffés sur trois génotypes différents.

L'analyse des résultats de la fréquence montre que les trois porte greffes présentent des valeurs presque identiques (MM106 ; 22,21%, MM111; 19,49%, EM9 ; 22,93%). Ce qui suggère qu'en conditions naturelles, le système racinaire des trois génotypes a été atteint par le hairy root de manière homogène. Ce résultat est très intéressant du fait que parmi les trois porte greffes analysés le EM9 considéré comme récalcitrant [136], se révèle rhizogénisé d'une manière naturelle au même titre que les deux autres porte greffes (MM106 et MM111) considérés comme des espèces ne présentant pas de difficultés d'enracinement.

Le sol peut héberger des agrobactéries pathogènes qui peuvent survivre à court et à long terme en présence ou non d'une plante hôte sensible [127]. La présente étude, a montré que la fréquence d'atteinte par le hairy root est la même dans toutes les parcelles examinées. Ceci peut être expliqué par le fait que ces mêmes sols subissent chaque année le même type de culture d'après les informations données par les pépiniéristes. Cette pratique permet en l'occurrence d'accroître le taux de populations d'*Agrobacterium* spp. dans les sols et de les maintenir à des niveaux infectieux. Les agrobactéries pathogènes ont alors pu être libérées en quantités importantes dans le sol à travers les racines chevelues se trouvant sur le système racinaire.

D'un point de vue écologique, la 'logique' de la transformation génétique de la plante par *Agrobacterium* serait de détourner le métabolisme normal de celle-ci afin de produire des composés particuliers favorisant le pathogène, au niveau des tissus transformés [25]. Ces molécules sont les opines produites au niveau de la tumeur, et qui servent de nutriment azoté et carboné comme nous l'avons vu, elles sont utilisées de manière préférentielle par les bactéries hébergeant des gènes de catabolisme (portés par le plasmide Ti ou le plasmide Ri). Ainsi, la multiplication clonale des souches hébergeant les deux types de plasmides, permet d'assurer une bonne survie des souches pathogènes ; elle contribue par conséquent à pérenniser la contamination des sols. La conjugaison du plasmide Ri qui contribue à sa diffusion vers d'autres hôtes, est aussi facilitée par la présence d'opines libérées par le hairy root.

L'analyse des caractéristiques morpho-métriques du hairy root des plants de pommier cultivés dans la pépinière de Chebli et greffés sur le MM106, a montré une différence significative sur le nombre de sites d'insertion des racines chevelues, le nombre de racines et leur longueur par rapport aux lots témoins sans symptômes de hairy root. Nous pouvons conclure par conséquent que plus le nombre de sites est important plus le nombre de racines est accru, induisant par conséquent une croissance et une élongation des racines secondaires. Le système racinaire des plants du MM106 ne manifestant pas de symptômes de hairy root est moins développé caractérisé par un nombre réduit de racines et une longueur moindre.

L'association MM106/Golden delicious pour les plants avec hairy root montre une différence significative sur la croissance après analyse de la longueur et du diamètre de la tige principale par rapport aux lots témoins. Ce résultat nous paraît logique du fait que pour ce génotype, l'analyse précédente des paramètres morphométriques du hairy root; nombre de racines, longueur et nombre de sites chez ce porte greffe a montré un effet significatif. Par conséquent un système racinaire avec un nombre accru de racines présentant une longueur importante ainsi que, des sites rhizogènes permet une croissance intense en longueur et en épaisseur. Par ailleurs, les mesures de la hauteur et du diamètre

de la tige principale montrent un effet positif de ces deux paramètres sur la croissance des plants de pommier analysés.

Les analyses phénotypiques des plants greffés sur le MM106 porteurs de symptômes de hairy root identifient des plants avec une croissance et une masse racinaire accrue. Nos résultats concordent avec ceux de Moore et coll. [137]. La signification adaptative d'un tel développement extensif des racines peut inclure un ancrage amélioré et des interactions importantes avec le sol et les microorganismes de la rhizosphère ainsi qu'une forte résistance à la sécheresse [137]. En effet, ces derniers auteurs ont montré expérimentalement que des plants de pommier infectés avec *Agrobacterium rhizogenes* montrent une résistance accrue au stress hydrique comparés aux plants non infectés.

Cet effet bénéfique que nous avons rencontré sur des plants infectés naturellement et présentant des symptômes de hairy root pourrait être exploité pour augmenter l'enracinement d'espèces récalcitrantes. La multiplication végétative a des limites, en particulier d'ordre génétique. Dans le cas des productions de ligneux et en particulier d'arbres fruitiers, le bouturage n'est réalisable que sur un nombre limité de variétés à cause de leur aptitude médiocre à l'enracinement. Pour tenter d'améliorer ce caractère, la stratégie choisie est d'utiliser le système de transformation génétique naturel d'*Agrobacterium rhizogenes* [138]. Cette transformation ouvre des possibilités de transfert de gènes, en particulier des fonctions rhizogènes au ligneux déficients pour ce caractère [139].

En contraste, pour l'association EM9/Golden delicious, aucune différence significative entre les plants sains et les plants atteints de hairy root pour les paramètres analysés (diamètre et hauteur) n'a été obtenue. Ceci peut s'expliquer par le fait que ce génotype considéré comme récalcitrant présente un retard dans la réponse à la croissance. Les plants analysés sont âgés d'un an après greffage, cette durée est insuffisante pour l'expression de l'effet sur la croissance. Des auteurs ont montré que la différenciation cellulaire au niveau des racines est plus longue chez ces espèces récalcitrantes amenant par conséquent à un retard de

l'effet sur le phénotype [140]. Une analyse de la croissance après cette période d'âge serait plus judicieuse.

Le porte greffe EM9 s'est révélé dans certaines circonstances très difficile à enraciner même après utilisation de diverses souches d'*Agrobacterium rhizogenes* et l'association de différentes concentrations hormonales [141]. Dans d'autres travaux, la transformation du porte greffe EM9 n'était réussie qu'en utilisant la souche C58 c1 d'*Agrobacterium tumefaciens* et en y introduisant le gène *rolB* afin d'améliorer son enracinement [142].

Des expérimentations menées dans ce sens, montrent que les réponses à l'inoculation dépendent de la souche utilisée, du niveau d'expression des gènes, de la variété et du stade physiologique.

D'un point de vue anatomique, la rhizogénèse d'une racine normale et d'une racine de hairy root se développe à partir d'un meristémioïde [140]. Le manque ou une faible expression d'une réponse à l'enracinement macroscopique dans une espèce arboricole récalcitrante pourrait être associé à divers facteurs histologiquement détectables tels que, l'incapacité des cellules de l'explant pour organiser des méristemoides [140].

En arboriculture fruitière, le greffage constitue une méthode de multiplication végétative conforme, elle contribue à l'obtention d'un verger moderne homogène. Même si chaque espèce fruitière pose des problèmes particuliers, le porte-greffe présente plusieurs intérêts du fait qu'il permet d'élargir l'aire de culture d'une espèce fruitière hors de sa zone de prédilection dès lors que certaines conditions deviennent limites (conditions pédoclimatiques, stress biotiques et abiotiques...). Par ailleurs, il permet de modifier certaines caractéristiques de la variété greffon (vigueur, rapidité et importance de la mise à fruits).

En considérant les résultats obtenus, l'induction de racines chevelues par *Agrobacterium rhizogenes* est une technique qui pourrait être associée à la multiplication végétative des espèces récalcitrantes pour permettre une évolution du verger vers la qualité et la rentabilité. Les travaux réalisés par Lambert et ses

collaborateurs [139] ont montré que des plants de pommier M9b transformés par la souche A4 ou la souche 8196 d'*Agrobacterium rhizogenes* ont un système racinaire très ramifié et un système aérien normal. Ces mêmes plants élevés en pots depuis plusieurs années, présentent d'après ces auteurs, un développement aérien comparable au témoin. Pour ces seules raisons, le porte-greffe reste un élément incontournable dans un bon nombre de situations, même si les techniques de culture *in vitro* permettent aujourd'hui une multiplication de certaines variétés ou espèces récalcitrantes vis-à-vis des techniques horticoles classiques.

#### 4.2 Le hairy root en conditions naturelles ; effet bénéfique à court terme et probablement maladie à long terme ?

Dans la logique de l'explication du processus de la maladie, nous aboutissons au fait que le hairy root provoque chez la plante hôte une intrusion d'un fragment d'ADN ayant pour conséquence une colonisation génétique de la cellule végétale conduisant à un effet plutôt néfaste sur la physiologie de la plante [143]. En contraste, dans notre cas comme dans d'autres rapportés par plusieurs auteurs [137, 139], nous constatons d'après les résultats obtenus que les plants porteurs de symptômes de hairy root présentent une croissance plus importante du système racinaire et de la partie aérienne par rapport aux plants non chevelus. Faut-il maintenant revoir la notion de 'maladie' après l'intérêt biotechnologique du processus de l'interaction *Agrobacterium*/plante, qui a été exploité pour produire des plantes génétiquement modifiées ? En effet, on assiste actuellement à une recrudescence du nombre de gènes d'intérêt comme ceux déterminant des résistances à des herbicides, une résistance accrue à certains agents infectieux, des gènes de production de métabolites secondaires, des gènes de production de protéines et des gènes permettant de détoxifier des milieux pollués.

Des travaux rapportés par d'autres auteurs suggèrent par contre qu'il y'a plutôt un effet négatif sur la croissance. Ces mêmes auteurs montrent que l'utilisation d'*Agrobacterium rhizogenes* pour transformer des espèces pour l'enracinement induit chez la plante rhizogénisée en plus d'un système racinaire abondant, critère recherché, mais d'autres critères morphologiques comme une

diminution de la croissance, un nanisme, des feuilles gaufrées [144, 145, 146, 147, 148, 149]. Tout au début, Riker et coll. [150], a indiqué que les arbres de pommiers chevelus sont plus petits dans la longueur et le diamètre après 6 ans d'inoculation et encore plus petits après 25 ans.

Ces résultats sont tout a fait logiques si on se réfère aux oncogènes “*rol*”; chacun s'exprimant à sa manière. Si on considère l'opéron oncogène *rol* chez *Agrobacterium rhizogenes* constitué de 4 groupes de gènes. Le gène *rolA* provoque chez la plante transformée une croissance racinaire importante, *rolB* induit la formation de racines chevelues, *rolC*, perturbe la morphologie des plantes transformées, *rolD* induit un retard dans la formation des racines des plantes atteintes par le hairy root. Ce qui provoque une diminution de l'élongation racinaire.

On pourrait penser que l'utilisation d'*Agrobacterium rhizogenes* pour l'enracinement des espèces récalcitrantes affecte uniquement le système racinaire, c'est-à-dire en d'autres termes, le porte greffe utilisé pour l'assemblage du plant, par conséquent les effets de nanisme, gaufrage foliaire n'affecteront pas la partie aérienne puisque celle-ci est indépendante physiologiquement de la partie souterraine. Cependant, la continuité entre les vaisseaux conducteurs du xylème et du phloème y ait.

Il est intéressant de préciser que les racines formées à partir de disques foliaires de plants de tabac exprimant *A4-rolA* ont pour origine les vaisseaux du phloème, et plus particulièrement les vaisseaux blessés. Le gène *A4-rolA* montre une expression régulée au cours du développement de la plante [151].

Les plants de tabac exprimant le gène *A4-rolA* sous le contrôle de son propre promoteur présentent une forte accumulation de polyamines libres et notamment de putrescine surtout dans les racines [152, 153]. Les polyamines sont connues pour être des régulateurs de la croissance ayant un rôle important dans le développement des plantes et notamment pendant la division cellulaire [154].

D'après Xue et coll. [155], Le gène *rolA* codé sur le plasmide Ri d'*A. rhizogenes* cause des altérations dans le développement, y compris des caractéristiques du nanisme dans les plants transgéniques. le gène *rolA* a été incorporé dans le porte greffe de pommier M26 il a eu comme résultat une réduction dans la croissance ainsi qu'un phénotype nain.

#### 4.3. Des souches d'*Agrobacterium* spp. rhizogènes aussi efficaces que la souche de référence A4

Après l'inoculation des disques de carotte par les 70 souches d'*Agrobacterium* spp. appartenant au biovar 2, plusieurs réponses ont été obtenues suite à cette inoculation, des souches qui ont induit des cals et des racines, des souches qui ont stimulé la formation seulement de cals et 1 souche à induit la formation de tumeurs.

D'après ces résultats, nous avons pu sélectionner 42 souches ayant formé des racines donc rhizogènes caractérisées par une variabilité de réponse dans le nombre, la longueur et le diamètre des différentes racines induites suite à cette inoculation. Selon Lambert et coll. [139], les réponses à l'inoculation dépendent de la souche utilisée, du niveau d'expression des gènes, de la variété et de l'état physiologique de la plante. Cependant, nos résultats montrent qu'il est vraisemblable, qu'après une inoculation, certaines cellules sont transformées, ne peuvent évoluer vers une morphogènes racinaire avec certaines souches.

D'après les résultats, 60 % des souches d'*Agrobacterium* spp. biovar 2 isolées du sol montrent une dominance des souches rhizogènes, Ce taux relativement élevé des souches d'*Agrobacterium rhizogenes* pourrait expliquer un taux d'infestation très élevé observé dans les parcelles de la zone d'étude. Ces memes souches ont été isolées à partir de sols ayant reçu des plants fruitiers en pépinière y compris des porte greffes de pommier.

Les 12 souches les plus virulentes qui sont : **PKS<sub>411</sub>, PKR<sub>23</sub>, E<sub>32</sub>, H<sub>11</sub>, C<sub>13</sub>, B<sub>32</sub>, PKS<sub>34</sub>, PKR<sub>22</sub>, EKR<sub>414</sub>, F<sub>14</sub>, PKS<sub>213</sub>** en plus de la souche de référence **A4** ont

été sélectionnées selon le nombre de racines induites qui est plus élevé ainsi que le diamètre de ces racines qui est plus grand.

Le gène *rolC* de la bactérie phytopathogène *Agrobacterium rhizogenes* joue un rôle essentiel dans le développement de la maladie du chevelu racinaire et son expression dans les plantes en causant des morphologies substantiels et des changements biochimiques [156, 157]. Un effet stimuloire du gène *rolC* sur le métabolisme secondaire a été démontré par des investigations avec différents groupes de métabolites secondaires, tels que des alcaloïdes tropaniques [158], alcaloïdes de pyridique [63], alcaloïdes d'indole [159], ginsenosides [160], et anthraquinones [161, 162]. Ces données suggèrent qu'*A. rhizogenes* peut perturber le métabolisme secondaire des plantes hôtes par un oncogène T-DNA par le biais du mécanisme signalant (mediated signaling mechanism).

Park et Facchini [163], ont testé l'efficacité de trois souches bactériennes sur l'Opium. Ces derniers auteurs rapportent que les trois souches donnent un taux de réactivité supérieur à 90%. Pour les douze souches testées lors de ce travail, le taux de réactivité est de 100 %. Toutes les souches se valent donc pour ce paramètre.

Les taux d'induction varient en fonction des souches bactériennes selon Kovalenko and Maliuta [164], mais dépend aussi de l'espèce végétale à infecter [1]. Le taux d'induction est de 75 % chez *Artemisia annua* infectée par la souche *A<sub>4</sub>* [105], ce taux diminue à 55 % pour les explants de *Torenia forneri* infectés par la même souche. Le taux d'induction de la souche *A<sub>4</sub>* sur *Datura stramonium* var. *tatula* enregistré pour ce travail est de 85 %. La souche *A<sub>4</sub>* est la plus virulente des douze souches étudiées pour ce paramètre.

Sur *Vitis vinifera*, le temps d'apparition des racines est de 8 jours [165]. Le temps d'apparition des racines en fonction des souches varie de 8 à 13 jours environ mais ce dernier paramètre n'est pas significatif d'où l'égalité des souches pour ce paramètre.



Concernant le nombre de racines par explant, un travail menée par Park et Facchini [163] sur *Opium poppy*, montre que selon la souche utilisée, le nombre de racines induites par explant varie de 3 à 4. Le nombre de racines par explant enregistré dans notre cas, varie en moyenne de  $(1,00 \pm 0,00)$  pour la souche C<sub>13</sub> à  $(2,75 \pm 0,87)$  pour la souche EKR<sub>414</sub>. Cette dernière est la plus virulente des douze souches pour ce paramètre.

Le diamètre des racines induites varie en fonction des souches. Il est de  $(0,63 \text{ cm} \pm 0,31)$  pour la souche E<sub>32</sub> à  $(0,92 \text{ cm} \pm 0,18)$  pour la souche F<sub>14</sub>. C'est cette dernière qui est la plus performante pour l'induction de racines épaisses même plus performante que la souche de référence A<sub>4</sub>.

Nos résultats montrent que les réponses à l'inoculation dépendent des souches utilisées, du niveau d'expression des gènes. La virulence de chaque souche est exprimée par la masse de racines induites en fonction du taux d'induction, du nombre de racines, du temps d'apparition racinaire et du diamètre des racines. Pour cela, d'après l'ACP ainsi que la classification hiérarchique, les onze souches ont été classées selon leur capacité d'induire des racines, dans 4 groupes, dont chaque groupe de souches est plus performant pour des paramètres mais pas pour les autres. Le premier groupe qui contient la souche de référence la A<sub>4</sub>, comprend les souches PKS<sub>411</sub>, PKR<sub>22</sub> et PKS<sub>213</sub> qui sont les plus performantes. Le deuxième groupe contient les souches B<sub>32</sub>, H<sub>11</sub> et E<sub>32</sub> qui sont performantes pour le temps d'apparition de racines ainsi que le nombre de racines mais semblent être parmi les moins performantes pour le taux d'induction et le diamètre des racines. Le troisième groupe renferme PKR<sub>23</sub>, PKS<sub>34</sub>, F<sub>14</sub> et C<sub>13</sub> qui sont plus performantes pour les diamètres des radines induites. Le dernier groupe qui comprend la souche EKR<sub>414</sub> semble être la moins performante, surtout en termes de taux d'induction.

## CONCLUSION GENERALE

Dés le début des années 1930, la maladie du hairy root a été décrite comme représentant un problème économique sur le pommier. Les plants atteints par la maladie montrent un phénotype bien particulier; leur croissance est réduite, elles présentent une réduction de la dominance apicale, ce qui entraîne leur aspect touffu et la formation de nombreuses racines adventives. Par ailleurs, un suivi à long terme de la maladie a permis de déceler chez les plants atteints de hairy root, des feuilles gaufrées et des fleurs plus petites, d'où une réduction de la production de pollen et de graines.

L'apparition de racines chevelues au niveau du système racinaire des plants atteints par *Agrobacterium rhizogenes* favorise par conséquent, un développement de la partie souterraine au détriment de la partie aérienne.

D'autres travaux signalés dans la littérature, rapportent que cette maladie présente un effet bénéfique à la plante du fait que son système racinaire se trouve amplifié par un nombre important de racines de longueur idéale permettant une bonne nutrition hydrominérale et une fixation adéquate au sol. Il n'est de ce fait pas possible pour nous actuellement, de quantifier la part de la maladie et son effet négatif possible sur la croissance du moment que les plants analysés sont très jeunes et ils doivent être transplantés ailleurs. Un suivi concernant l'aspect 'maladie' sur les porte greffes étudiés serait plus judicieux. Les recherches à ce sujet devraient s'effectuer sur d'autres parcelles, d'autres pépinières et surtout sur un nombre important de porte greffes.

Dans le premier chapitre de ce document, nous avons montré que la maladie du hairy root est présente dans les trois pépinières étudiées (Boufarik, Soumaa et Chebli) et sur les trois porte greffes analysés (MM106, MM111 et EM9). Les fréquences sont relativement élevées et homogènes d'un porte greffe à un autre.

Le taux d'infection est de 22,21% chez le MM106, chez le MM111 de 19,49% et de 22,93% chez le porte greffe EM9.

Nos résultats montrent que le porte greffe MM106 atteint par le hairy root se caractérise par un nombre plus élevé de sites d'insertion de racines chevelues qui provoquent un nombre accru de racines induisant par conséquent une croissance et une élongation des racines secondaires. En revanche, chez le porte greffe EM9 présentant des symptômes de hairy root, les plants se caractérisent par un nombre de sites de départ des racines chevelues moins important, des racines moins développées et de longueur réduite.

L'analyse de l'effet du hairy root sur quelques paramètres de croissance de l'association MM106/Golden delicious montre une différence significative. Il semble par conséquent que le hairy root présente un effet positif sur la croissance, cependant pour le porte greffe récalcitrant EM9, aucun effet n'a été enregistré. D'autres investigations sont nécessaires pour mieux comprendre l'enracinement chez ce dernier génotype et son interaction avec *Agrobacterium rhizogenes*. Par ailleurs, le comportement des plants porteurs de hairy root en plein champ après infection doit être suivi et étudié.

La littérature rapporte que la transformation des microboutures et des jeunes plantes par *Agrobacterium rhizogenes* semble être une excellente manière d'améliorer l'enracinement des essences ligneuses. D'un point de vue économique l'enracinement constitue un phénomène important pour l'agriculture, l'horticulture et la sylviculture. La formation de racines adventices constitue une étape clé dans la multiplication végétative qui est de plus en plus utilisée pour multiplier les espèces végétales élites obtenues après des programmes de sélection ou choisies parmi des clones naturels. Des pertes souvent surviennent car les boutures ne forment pas de racines. D'un point de vue scientifique, l'enracinement est un système de développement très intéressant. Il constitue une des trois principales manières de la régénération d'organes en plus de la formation de pousses adventices et de l'embryogénèse somatique.

Cet effet bénéfique que nous avons rencontré sur des plants infectés naturellement et présentant des symptômes de hairy root pourrait être exploité pour augmenter l'enracinement d'espèces récalcitrantes. La multiplication végétative a des limites, en particulier d'ordre génétique. Dans le cas des productions de ligneux et en particulier d'arbres fruitiers, le bouturage n'est réalisable que sur un nombre limité de variétés à cause de leur aptitude médiocre à l'enracinement.

Le mécanisme d'interaction, *Agrobacterium/plante* a été exploité pour un intérêt biotechnologique pour produire des plantes génétiquement modifiées comme la particularité de corriger la récalcitrance de certaines espèces végétales difficiles à enracer. En effet, l'enracinement constitue un préalable à la production réussie de plants viables. L'utilisation d'*Agrobacterium rhizogenes* en biotechnologie a concerné également la production de métabolites secondaires et l'élimination de molécules toxiques des effluents industriels.

De ce qui précède nous remarquons plutôt un effet positif sur la croissance du porte greffe MM106 Par conséquent, un effet positif sur la croissance des plants de la variété Golden delicious greffée sur le porte greffe MM106 atteint par rapport aux plants sains sous conditions naturelles.

Concernant les souches d'*Agrobacterium* spp. appartenant au biovar 2, parmi les 70 souches, 42 souches, se révèlent rhizogènes. Après avoir induit des racines sur les disques de carotte, les souches ont été classées selon les paramètres ; le nombre et le diamètre des racines induites. Cependant, douze souches : PKS<sub>411</sub>, PKR<sub>23</sub>, E<sub>32</sub>, H<sub>11</sub>, C<sub>13</sub>, B<sub>32</sub>, PKS<sub>34</sub>, PKR<sub>22</sub>, EKR<sub>414</sub>, F<sub>14</sub>, PKS<sub>213</sub> en plus de la souche de référence A<sub>4</sub>, ont été choisies pour être les plus performantes. Ces dernières souches testées sur le *Datura stramonium* var *tatula* pour un essai d'induction racinaire ont montré une variabilité de réponse concernant les paramètres choisis : Le taux de réactivité (TR ),le taux d'induction des racines (TD), le temps d'apparition de la première racine (TPS), le nombre de racines par explant (NR) et le diamètre moyen des racines (DIA).

Les résultats obtenus sur l'ACP et la classification hiérarchique révèlent une variabilité de performance des souches en fonction des paramètres considérés. La classification hiérarchique et l'analyse des composantes principales a permis de faire un groupement en quatre classes des différentes souches bactériennes selon les paramètres étudiées. La souche EKR<sub>414</sub> semble être la moins performante en ce qui concerne le taux d'induction. Elle est suivie par les souches PKR<sub>23</sub>, PKS<sub>34</sub>, F<sub>14</sub> et C<sub>13</sub> qui sont plus performantes pour les diamètres des radines induites, alors qu'elles présentent un taux d'induction modéré. Les souches les plus performantes sont la PKS<sub>411</sub>, PKR<sub>22</sub> et PKS<sub>213</sub> et peuvent avoir un pouvoir d'induction racinaire identique à celui de la souche A4.

Cette originalité de l'étude du hairy root *in situ* et *in vitro*, justifie la poursuite de telles études pouvant apparaître à priori académiques et qui finalement apportent des informations intéressantes sur l'épidémiologie de la maladie et sur la compréhension du mécanisme de l'interaction *Agrobacterium*-plante. Ces résultats nous amènent à nous poser des questions sur les capacités d'un plasmide ou d'une bactérie à s'adapter dans différentes conditions environnementales.

## Annexe A

## LISTE DES ABREVIATIONS

<i>A. tumefaciens</i>	: <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>A. rhizogenes</i>	: <i>Agrobacterium rhizogenes</i>
<i>A. rubi</i>	: <i>Agrobacterium rubi</i>
<i>A. vitis</i>	: <i>Agrobacterium vitis</i>
<i>A. fici</i>	: <i>Agrobacterium fici</i>
<i>A. larrymorei</i>	: <i>Agrobacterium larrymorei</i>
<i>A. radiobacter</i>	: <i>Agrobacterium radiobacter</i>
pRi	: Plasmide “root inducing”
pTi	: Plasmide “tumor inducing”
AND	: Acide <b>D</b> esoxyribo <b>N</b> ucleique
ARN	: Acide <b>R</b> ibosomal <b>N</b> ucleique
ORF	: <b>O</b> pen <b>R</b> eadin <b>G</b> <b>F</b> rame
Kb	: <b>K</b> ilo de <b>B</b> ase
NLS	: <b>N</b> uclear <b>L</b> ocalisation <b>S</b> ignal
KDa	: <b>K</b> ilodalton
%	: <b>P</b> ourcentage
n°	: <b>N</b> uméro
ha	: <b>h</b> ectare
EAC	: <b>E</b> xploitation <b>A</b> gricole <b>C</b> ollective
Km	: <b>K</b> ilomètre
°C	: <b>D</b> égréé <b>C</b> elsius
h	: <b>H</b> eure
ml	: <b>m</b> illilitre
DO	: <b>D</b> ensité <b>O</b> ptique
g/l	: <b>g</b> ramme par litre
CFU/ml	: <b>C</b> olony- <b>F</b> orming <b>U</b> nits par <b>m</b> illilitre
cm	: <b>c</b> entimetre
mg/l	: <b>M</b> illigramme par litre
LSD	: <b>L</b> east <b>S</b> ignificant <b>D</b> ifference

## Annexe B

## RESULTATS DE L'ANALYSE DE LA VARIANCE

Tableau. Résultats de l'analyse de la variance du nombre de sites rhizogènes, nombre moyen et longueur moyenne des racines chevelues chez le MM106.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Nombre de sites rhizogènes par plant					
Intergroupes	13,6563	1	13,6563	5,82	0,0177
Intragroupes	234,657	100	2,34657		
Total (Corr.)	248,314	101			
Longueur moyenne de racines par site par plant					
Intergroupes	260,564	1	260,564	99,92	0,0000
Intragroupes	260,776	100	2,60776		
Total (Corr.)	521,34	101			
Nombre moyen de racines par site par plant					
Intergroupes	15462,2	1	15462,2	187,92	0,0000
Intragroupes	8228,08	100	82,2808		
Total (Corr.)	23690,3	101			

## Annexe C

### Test LSD

Tableau. Tests des étendues multiples pour la longueur moyenne des racines par site et par traitement

Méthode: 95,0 % LSD

Traitement	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
MM106 Starkrimson T	88	6,2125	X
MM106 Starkrimson C	14	10,8571	X

<i>Traitement</i>	<i>Sig.</i>	<i>Différence</i>
MM106 Starkrimson C - MM106 Starkrimson T	*	4,64464

\* indique une différence statistiquement significative.

Tableau. Tests des étendues multiples pour le nombre moyen de racines par site et par traitement

Méthode: 95,0 % LSD

Traitement	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
MM106 Starkrimson T	88	24,3636	X
MM106 Starkrimson C	14	60,1429	X

Traitement	Sig.	Différence
MM106 Starkrimson C - MM106 Starkrimson T	*	35,7792

\* indique une différence statistiquement significative.

**Tableau. Tests des étendues multiples pour le nombre de site par traitement**

Méthode: 95,0 % LSD

Traitement	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
MM106 Starkrimson T	88	5,57955	X
MM106 Starkrimson C	14	6,64286	X

Traitement	Sig.	Différence
MM106 Starkrimson C - MM106 Starkrimson T	*	1,06331

\* indique une différence statistiquement significative.



Annexe D  
RESULTATS DE L'ANALYSE DE LA VARIANCE

Tableau. Résultats de l'analyse de la variance de l'effet du hairy root sur la croissance des porte greffes MM106 et EM9.

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>
Hauteur des tiges principales					
Intergroupes	6809,07	3	2269,69	19,14	<b>0,0000</b>
Intragroupes	11382,4	96	118,566		
Total (Corr.)	181914,4	99			
Diamètre des tiges principales					
Intergroupes	62,4659	3	20,822	11,66	<b>0,0000</b>
Intragroupes	171,423	96	1,7856		
Total (Corr.)	233,889	99			

## Annexe E

## Test LSD

Tableau. Tests des étendues multiples pour le diamètre des tiges par traitement EM9 et MM106

Méthode: 95,0 % LSD

Traitement	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
EM9 Golden delicious C	25	5,888	X
EM9 Golden delicious T	25	6,4	XX
MM106 Golden delicious. T.	25	7,108	X
MM106 Golden delicious C.	25	7,992	X

Traitement	Sig.	Différence
MM106 Golden D. T. - EM9 Golden D C	*	1,22
MM106 Golden D. T. - EM9 Golden D T		0,708
MM106 Golden D. T. - MM106 Golden D. C.	*	-0,884
EM9 Golden D C - EM9 Golden D T		-0,512
EM9 Golden D C - MM106 Golden D. C.	*	-2,104
EM9 Golden D T - MM106 Golden D. C.	*	-1,592

\* indique une différence statistiquement significative.

## Annexe F

### Test LSD

Tableau. Tests des étendues multiples pour taille des tiges par traitement EM9 et MM106

Méthode: 95,0 % LSD

TRAITEMENT	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
EM9 Golden delicious T	25	54,82	X
EM9 Golden delicious C	25	59,88	XX
MM106 Golden delicious T.	25	65,78	X
MM106 Golden delicious C.	25	76,98	X

TRAITEMENT	Sig.	Différence
MM106 Golden delicious. T. - EM9 Golden delicious T	*	10,96
MM106 Golden delicious. T. - EM9 Golden delicious C		5,9
MM106 Golden delicious T. - MM106 Golden delicious C.	*	-11,2
EM9 GOLDEN delicious T - EM9 Golden delicious C		-5,06
EM9 GOLDEN delicious T - MM106 Golden delicious C.	*	-22,16
EM9 Golden delicious C - MM106 Golden delicious C.	*	-17,1

\* indique une différence statistiquement significative

## Annexe G

### MILIEUX DE CULTURE

Milieu MG (Manitol-glutamate) (Keane et *al.*, 1970)

Par litre

Manitol .....	5 g
L-glutamic acid.....	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,5 g
NaCl.....	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
Extrait de levure.....	0,5 g
pH.....	7,2
Agar .....	15 g

(Autoclaver 20 mn à 120 °C)

## Annexe H

### MILIEUX DE CULTURE

Bouillon nutritif LB

Par litre

Bracto tryptone.....	10 g
Extrait de levure.....	5 g
NaCl.....	5 g

(Autoclaver 20 mn à 120 °C)

Annexe I  
MILIEUX DE CULTURE

Milieu YEM (Vincent, 1970)

	Par litre
Manitol .....	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5 g
NaCl.....	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
Extrait de levure.....	0,4 g
pH.....	7,2
Agar .....	15 g

(Autoclaver 20 mn à 120 °C)

Annexe J  
MILIEU MURACHIGUE ET SKOOG

Tableau. Composition de milieu de base Murachigue et Skoog (1962)

Macroéléments	mg /l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
K NO <sub>3</sub>	1900
Mg SO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	440
Ca Cl <sub>2</sub> ,2H <sub>2</sub> O	370
K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
Microéléments	mg /l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
Mn SO <sub>4</sub> ,4H <sub>2</sub> O	22,30
Zn SO <sub>4</sub> ,4H <sub>2</sub> O	8,60
KI	0,83
Na <sub>2</sub> Mo O <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	0,25
Cu SO <sub>4</sub> ,5H <sub>2</sub> O	0,025
CO Cl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	0,025
Fer EDTA	mg /l
Fe SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	27,85
Na <sub>2</sub> EDTA	37,25
Vitamines	mg /l
Glycine	2,00
Acide nicotinique	0,50
Pyridoxine HCl	0,50
Myo inositol	100

## Annexe K

### Selection des souches rhizogènes

Tableau. Souches d'Agrobacterium spp. biovar 2

Souches	B – Cetolactose
PKS 418	–
PKS 28	–
PKS 26	–
PKS 213	–
PKS 215	–
PKS 48	–
PKS 416	–
PKS 421	–
PKS 46	–
PKS 34	–
PKS 21	–
PKR 116	–
PKR 47	–
PKR 212	–
PKR 416	–
PKR 23	–
PKR 22	–
PKR 24	–
PKR 21	–
PKR 410	–
PKR 413	–

Souches	B – Cetolactose
PKR 411	–
PKR 414	–
PKR 415	–
EKS 23	–
EKS 49	–
EKS 24	–
EKS 13	–
EKS 414	–
PNS 226	–
PNS 214	–
PNS 218	–
PNS 18	–
PNS 220	–
PNS 219	–
PNS 24	–
PNS 46	–
PNS 221	–
PNS 216	–
PNS 49	–
PNS 423	–
PNS 429	–
PNS 42	–
PNS 410	–
PNS 422	–
PNS 28	–
PNR 23	–
A 16	–
A 11	–
B 18	–
B 32	–
C 12	–



Souches	B – Cetolactose
C 15	–
D 12	–
D 15	–
D 13	–
D 41	–
E 13	–
E 14	–
E 32	–
E 33	–
F 14	–
F 12	–
G 12	–
G 15	–
G 13	–
H 15	–
H 11	–
H 21	–
H 43	–

## Annexe K

RESULTATS DE LA SELECTION DE SOUCHES D'*Agrobacterium*  
spp. RHIZOGENES

Tableau : Pouvoir pathogène (rhizogène) des souches testées sur disques  
de carotte.

Souches	Nombre moyens des racines	Longueur moyenne des racines	Diamètre moyen des racines
<b>A4</b>	<b>294 ± 1,20</b>	<b>14,02 ± 11,05</b>	<b>0,59 ± 0,17</b>
<b>PKS411</b>	<b>11 ± 3,17</b>	<b>16,97 ± 18,35</b>	<b>0,84 ± 0,27</b>
<b>PKR23</b>	<b>10 ± 4,99</b>	<b>14,41 ± 11,71</b>	<b>1,56 ± 0,37</b>
<b>E32</b>	<b>18 ± 1,25</b>	<b>11,34 ± 10,37</b>	<b>0,69 ± 0,23</b>
<b>H11,</b>	<b>23 ± 4,30</b>	<b>8,36 ± 5,66</b>	<b>0,63 ± 0,18</b>
<b>C13.</b>	<b>4 ± 0,36</b>	<b>14,33 ± 15,11</b>	<b>0,93 ± 0,12</b>
<b>B32</b>	<b>21 ± 2,30</b>	<b>9,29±7,35</b>	<b>0,68 ± 0,21</b>
<b>PKS34</b>	<b>14 ± 1,49</b>	<b>8,82±8,38</b>	<b>0,67 ± 0,32</b>
<b>PKR22</b>	<b>55 ± 0,27</b>	<b>10,76 ± 12,69</b>	<b>0,58 ± 0,16</b>
<b>EKR414.</b>	<b>15 ± 0,12</b>	<b>11,8 ± 9,95</b>	<b>0,72 ± 0,20</b>
<b>F14</b>	<b>16 ± 0,32</b>	<b>6,68±4,49</b>	<b>0,7 ± 0,28</b>
<b>PKS213</b>	<b>14 ± 3,17</b>	<b>9,21 ± 9,85</b>	<b>0,76 ± 0,27</b>
D331	3 ± 2,52	9,3 ± 5,54	0,69 ± 0,20
D41	6 ± 2,65	9,67 ± 6,25	0,74 ± 0,31
H15,	6 ± 3,41	6,87 ± 5,38	0,7 ± 0,24
PNS221.	4 ± 0,12	3,25 ± 1,89	0,50 ± 0,39
G12.	1 ± 0,00	3±2,83	0,7 ± 0,00
F12.	2 ± 0,00	4,50 ± 2,12	0,5 ± 0,00

PKR116.	$4 \pm 0,00$	$8,5 \pm 4,24$	$0,63 \pm 5,88$
D12.	$2 \pm 0,00$	$24,5 \pm 1,41$	$0,7 \pm 19,33$
D13.	$2 \pm 0,00$	$5,25 \pm 0,50$	$0,5 \pm 0,17$
D15.	$10 \pm 0,00$	$3,6 \pm 1,17$	$0,5 \pm 0,00$
E331.	$5 \pm 3,20$	$4,76 \pm 3,94$	$0,7 \pm 0,17$
A16.	$30 \pm 0,00$	$15,8 \pm 11,43$	$0,4 \pm 0,00$
C151	$5 \pm 2,83$	$12,5 \pm 7,50$	$0,5 \pm 0,00$
EKS49	$7 \pm 7,07$	$39,64 \pm 20,82$	$0,77 \pm 0,25$
PNS18	$8 \pm 0,00$	$8,38 \pm 5,68$	$0,5 \pm 0,00$
E33	$3 \pm 0,00$	$7,33 \pm 3,06$	$1 \pm 0,00$
E2X	$3 \pm 1,79$	$7,21 \pm 5,25$	$0,75 \pm 0,19$
G15	$9 \pm 2,12$	$14,59 \pm 19,02$	$0,5 \pm 0,00$
C15	$5 \pm 3,54$	$19,44 \pm 24,56$	$0,5 \pm 0,00$
PKS26	$9 \pm 7,59$	$6,5 \pm 4,60$	$0,58 \pm 0,16$
PKS44	$2 \pm 0,00$	$10 \pm 2,83$	$0,8 \pm 0,00$
E17	$5 \pm 5,66$	$5 \pm 2,16$	$0,8 \pm 0,36$
PKR24	$6 \pm 3,83$	$6,96 \pm 3,53$	$0,5 \pm 0,00$
H21	$2 \pm 1,00$	$7,97 \pm 7,22$	$1,05 \pm 0,50$
B18	$5 \pm 1,41$	$9,55 \pm 9,58$	$0,57 \pm 0,08$
E14	$2 \pm 0,00$	$17,5 \pm 21,92$	$0,5 \pm 0,00$
C40	$17 \pm 12,02$	$19,94 \pm 28,00$	$0,65 \pm 0,21$
C44	$14 \pm 0,00$	$13 \pm 11,71$	$0,5 \pm 0,00$
PKR414	$2 \pm 0,58$	$7,86 \pm 4,06$	$1,1 \pm 0,00$
PKR21	$6 \pm 6,40$	$9,22 \pm 7,10$	$0,87 \pm 0,21$
PKR47	$4 \pm 0,82$	$9,25 \pm 2,36$	$1 \pm 0,71$

Annexe L  
RESULTATS DE L'ANALYSE DE LA VARIANCE

Tableau. Résultats de l'analyse de la variance de l'étude du pouvoir d'induction racinaire des souches d'*Agrobacterium* spp. sélectionnées sur le *Datura*.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Le taux d'induction					
Intergroupes	9,04583	11	0,822348	3,79	<b>0,0001</b>
Intragroupes	49,45	228	0,216886		
Total (Corr.)	58,4958	239			
Temps d'apparition des racines					
Intergroupes	129,071	11	11,7338	1,27	0,2795
Intragroupes	332,179	36	9,22718		
Total (Corr.)	461,25	47			
Nombre de racines par explant					
Intergroupes	12,6207	11	1,14734	1,59	0,1109
Intragroupes	85,2562	118	0,72251		
Total (Corr.)	97,8769	129			
Diamètre des racines induites					
Intergroupes	1,09654	11	0,0996859	2,29	<b>0,0121</b>
Intragroupes	7,43132	171	0,043458		
Total (Corr.)	8,52787	182			

## REFERENCES

1. De Cleene, M., De Ley, J., "The host range of infectious hairy root", *Bot Rev.*, 47, (1981), 147-194
2. Tepfer, D., "Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*", *Physiol Plant*, 79, (1990), 140-146
3. Porter, J.R., "Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*", *Critical Reviews in Plant Sciences*, vol. 10, n°4, (1991), 387-421.
4. Sutter, E.G., and Luza, J., "Developmental anatomy of roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* in *malus pumila* 'M26' shoots grown in vitro", *International Journal of Plant Sciences*, 154, (1993), 59-67.
5. Damiano, C., Archilletti, T., Caboni, E., Lauri, P., Falasca, G., Mariotti, D., Ferraiolo, G., "*Agrobacterium* mediated transformation of almond : in vitro rooting through localized infection of *A.rhizogenes*", w.t. *Acta Horticulturae* 392, (1995), 161-169
6. Khelifi, L., Haddad, B., Haddad, N., Khelifi-Slaoui, M., Amdoun, R., Mendil, M., "Transformation génétique de l'olivier : une alternative pour améliorer sa multiplication végétative. *Biotechnologies végétales*", n°1. Ed. INA – ALGER, (2007), 10-14.
7. Strobel, G.A., Nachmias, A., "*Agrobacterium rhizogenes* promotes the initial growth of bare root stock almond", *J Gen Microbiol* 131, (1985), 1245-1249
8. Strobel, G.A., Nachmias, A., Hess, W.M., "Improvement in the growth and yield of olive trees by transformation a it h the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*", *Can.J.* 13m, 66, (1988), 2581-2585.
9. Christey M.C., "Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants", *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 37 (2001) 687–700.
10. Rinallo, C., Mittempergher, L., Frugis G. and Mariotti, D., "Clonal propagation in the genus *Ulmus*: Improvement of rooting ability by *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes", *J. Hort. Sci. Biotech.* 74 (4), (1999), 502-506.

11. Bergey, D.H., "Family *Rhizobiaceae* –genus *Agrobacterium*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". N. R. Krieg and J. G. Holt. Baltimore, Williams & Wilkins. 1, (1984), 244-256.
12. Kersters, K., and De Ley, J., "Genus *Agrobacterium* - Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Baltimore, Williams and Wilkins, (1984).
13. Paulin, J.P., Michel, R., Prunier, J.P., "Découverte des bactéries phytopathogènes il y a cent ans: controverses et polémiques transatlantiques", C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie, 324, (2001), 905-914.
14. Ophel, K., and Kerr, A., "*Agrobacterium vitis* - new species - for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevine", Int. J. Syst. Bacteriol. 40, (1990), 236-241.
15. Bouzar, H., and Jones, J. B., "*Agrobacterium larrymoorei* sp. Nov. , a pathogen isolated from aerial tumors of *Ficus benjamina*", Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, (2001), 1023-1026.
16. Watson, B.T., Currier, C., Gordon, M.P., Chilton, M.D., and Nester, E.W., "Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*", J. Bacteriol, (1975), 123:255-264.
17. Zhu, J.P., Oger, P., Schrammeijer B., P. Hooykaas, J.J., Farrand, S.K., Winnans, S.C., "The bases of crown gall tumorigenesis", J. Bacteriol, 182, (2000), 3885-3895.
18. Kerr, A. and Panagopoulos, C.G., "Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological contro". Phytopathol. Z. 90, (1977), 172-179.
19. Sawada, H., Ieki, H., Oyaisu, H., Matsumoto, S.. "Proposal of rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*", Int. J. Syst. Bacteriol, 43 (1993), 694-702.
20. Bouzar, H., Jones, J.B., Hodge, N. C., "Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon -source utilization patterns and fatty acid profiles", Phytopathology, 83, (1993), 733-739.
21. Bouzar, H. , Chilton, W.S., Nesme, X., Dessaux, Y., Vaudequin, V., Petit, A., Jones, J.B., Hodge, N.C., "A new *Agrobacterium* strain isolated from aerial tumors on *Ficus benjamina* L.", Appl. Environ. Microbiol. 61, (1995), 65-73.

22. Ponsonnet, C., and Nesme, X., 1994. "Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions", Arch. Microbiol. 161, (1994), 300-309.
23. Young, J. M., Bull, C. T., De Boer, S. H., Firrao, G., Gardan, L., Saddler, G. E., Stead, D. E., and Takikawa, Y., "Classification, nomenclature and plant pathogenic bacteria – A clarification", Phytopathology, 91, (2001), 617-620.
24. Ullman, J.S., and M.c., Carthy, B.J., "The relation ship between mismatched base pairs and the thermal stability of DNA duplexes .I. Effects of depurination and chain scission", Biochim.Biophys.Acta, 294, (1973), 405-415.
25. Zambryski, P., Tempé, J., Schell, J., "Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants", Cell 56, (1989), 193-201.
26. Chilton, M. D., Drumond, M. H., Merlo, D J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M.P., Nester, E W., "Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis", Cell 11, (1977), 263-271.
27. Szegedi, E., Otten, L., Czako, M., "Diverse types or tartrate plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* biotype IR strains", Mol.Plant-Microbe Interact, 5, (1992), 435-438.
28. Otten, L., Crouzet, P., Salomone, J.Y., De Ruffray, P., Szegedi, E., "Agrobacterium vitis strain AB3 harbors two independent tartrate utilization systems, one of wich is encoded by the Ti plasmid", Mol. Plant-Microbe Interact, 8, (1995), 138-146.
29. Salomone, J.Y., Crouzet, P., De Ruffray P., Otten L., "Characterization and distribution of tartrate utilization genes in the grapevine pathogen *Agrobacterium vitis*", Mol Plant-Microbe Interact, 9, (1996) 401-408.
30. Salomone, J.Y., Szegedi, E., Cobanov P., Otten, L., "Tartrate utilization genes promote growth of *Agrobacterium* spp. On grapevine", Mol Plant-Microbe Interact, 11, (1998), 836-838
31. Petit, A., David, C., Dahl, G.,AEllis, , J.G., Guyon, P.,Casse-Delbart, F., Tempé J., "Further extension of the opine concept : plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation", Mol. Gen. Genet. 190, (1983), 204-214.
32. Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O., Zambryski, P., "The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants : a feast of fundamental insights", Plant J. 23, (2000), 11-28.

33. Willmitzer, L., Simons, G., Schell, J., "The TL-DNA in octopine crown-gall tumors codes for seven well-defined polyadenylated transcripts", *EMBO J.*, 1, (1982), 139-146.
34. Aoyama, T., Takanami, M., Oka, A., "Signal structure for transcriptional activation in the upstream regions of virulence genes on the hairyroot-inducing plasmid A4", *Nucleic Acids Res.* 17, (1989), 8711–8725.
35. Birot, A. M., and Casse-Delbart, F., "Map location on *Agrobacterium* root-inducing plasmids of homologies with the virulence region of tumorinducing plasmids", *Plasmid* 19, (1988), 189–202.
36. Jouanin, L., "Restriction map of an agropine-type Ri plasmid and its homologies with Ti plasmids", *Plasmid* 12, (1984), 91–102.
37. Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Hardayani, N. S., Kataoka, M., Tanaka, N., Yoshida, K., "The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae", *J. Mol. Biol.* 307, (2001), 771–784.
38. Liang, Y., Aoyama, T., Oka, A., "Structural characterization of the virB operon on the hairy root-inducing plasmid A4", *DNA Res* 5, (1998), 87-93
39. Tanaka N., Ikeda T., Oka A., "Nucleotide sequence of the rol region of the mikimopine-type root-inducing plasmid pRi1724", *Biosci Biotechnol Biochem*, (1994), 58: 548-551
40. Tanaka, N., et Oka, A., "Restriction endonuclease map of the root-inducing plasmid (pRi1724) of *Agrobacterium rhizogenes* strain MAFF03-1724", *Biosci. Biotech. Biochem*, 58, (1994), 297-299.
41. Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Kataoka, M., Tanaka, N., Yoshida, K., "Analysis of unique variable region of a plant root inducing plasmid pRi1724, by the construction of its physical map and library", *DNA Res.* 7, (2000), 157-163.
42. Huffman, GA., White, FF., Gordon, MP., Nester, EW., "Hairy-root inducing plasmid: physical map and homology to tumor-inducing plasmids", *J Bacteriol* 157, (1984), 269-276.
43. Tsudzuki, T., A "graphic tool for circular genome maps", *Nucl. Acids Symp.*, 44, (2000), 189-190.



44. Slightom, J.L., Duran-Tardif, M., Jouanin, L., Tepfer, D., "Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*" agropine type Plasmide", *J Biol Chem*, 261, (1986), 108-121
45. Jouanin, L., Guerche, P., Pamboukdjian, N., Tourneur, C., Casse Delpart, F., Tourneur, J., "structure of T-DNA in plants regenerated from roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* strain A4", *Mol Gen Genet* 206, (1987), 387-392
46. Hansen, G., Larribe, M., Vaubert, D., Tempé, J., Biermann, B.J., Montoya, AL., Chilton, M-D., Brevet, J., "Agrobacterium rhizogenese pRi8196 T-DNA : mapping and DNA sequence of fonctions involved in mannopine synthesis and hairy root differentiation", *Proc Natl Acad Sci USA* 88, (1991), 7763-7767
47. White, F.F., Taylor, B.H., Huffman ,G.A., Gordon, M.P., Nester, E.W., "Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-including plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*", *J. Bacteriol*, 164, (1985), 33-44.
48. Maeda, Y., Moriguchi, K., Kataoka, M, Satou, M., Niken Satuti, NH., Tanaka, N. Yoshida, K., Genome structure of Ri plasmid (2). Sequencing analysis of T-DNA and its flanking regions of pRi1724 in Japanese *Agrobacterium rhizogenes*", *Nucleic Acid Symp.*, 42, (1999), 67-68.
49. Niken Satuti, NH., Kazuki Moriguchi, Megumi Sato, Miho Kataoka, Yasunobu Maeda, Nobukazu Tanaka and Kazuo Yoshida, "Genome structure of Ri plasmid (3). Sequencing analysis of the *vir* region of pRi 1724 in Japanese *Agrobacterium rhizogenes*", *Oxford University Press Nucleic Acids Symposium Series ( 44)*, (2000), 95-96.
50. Satuti, N., Moriguchi, K., Sato, M., Kataoka, M., Maeda, Y., Tanaka, N., Yoshida, K., "Genum structure of Ri plasmid (3). Sequencing analysis of the *vir* region of pRi1724 in Japanese *Agrobacterium rhizogenes*", *Nucleic Acids Symp. Ser.*, (2000), 44:95-96.
51. Hodges, LD., Cuperus, J., Ream, W., "*Agrobacterium rhizogenes* GALLS protein substitutes for *Agrobacterium tumefaciens* single-stranded DNA-binding protein VirE2", *J Bacteriol* 186, (2004), 3065-3077
52. Dombek, P., and Ream, W., "Functional domains of *Agrobacterium tumefaciens* single-stranded DNA-binding protein VirE2", *J. Bacteriol.* 179, (1997), 1165–1173.
53. Ward, D. V., and Zambryski, P., "The six functions of *Agrobacterium* VirE2", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, (2001), 385–386.

54. Sundberg, C. D., and Ream, W., "The *Agrobacterium tumefaciens* chaperone-like protein, VirE1, interacts with VirE2 at domains required for single-stranded DNA binding and cooperative interaction", *J. Bacteriol*, 181, (1999), 6850–6855.
55. Zhou, X. R., and Christie P. J., "Mutagenesis of the *Agrobacterium* VirE2 single-stranded DNA-binding protein identifies regions required for self-association and interaction with VirE1 and a permissive site for hybrid protein construction", *J. Bacteriol*, 181, (1999), 4342–4352.
56. Melchers, L.S., Regensburg-Tuïnk, T.J.G., Bourret, R.B., Sedee, N.J.A., Schilperoort, R.A., Hooykaas, P.J.J., "Membrane topology and functional analysis of the sensory protein *vir A* of *Agrobacterium tumefaciens*", *EMBO J.* 8, (1989), 1919-1989.
57. Meyer, AD., Tempé, J., Costantino, P., "Hairy root: a molecular overview. Functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes", In G Stacy, NT Keen, eds, *Plant Microbe Interactions*. APS Press, St. Paul, MN, (2000), 93-139.
58. Pandolfini, T., Storlazzi, A., Calabria, E., Defez, R., Spena, A., "The spliceosomal intron of the *rolA* gene of *Agrobacterium rhizogenes* is a prokaryotic promoter", *Mol Microbiol* 35, (2000), 1326-1334.
59. Altamura, M.M., "*Agrobacterium rhizogenes rolB* and *rolD* genes: regulation and involvement in plant development", *Plant Cell Tissue Org Cult* 77, (2004), 89-101
60. Nilson, O., and Olsson, O., "Getting to the root : the role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of hairy roots", *Physio. Plant.* 100, (1997), 463-473.
61. Schmulling, T., Schell, J., and Spena, A., "Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development", *EMBO J.* 7, (1988), 2621-2629.
62. Oono, Y., Kanaya, K., Uchimiya, H., "Early flowering in transgenic tobacco plants possessing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid", *Jpn J Genet* 68, (1990), 7-16.
63. Palazón, J., Cusido, RM., Roig, C., Pino, MT., "Expression of the *rolC* gene and nicotine production in transgenic roots and their regenerated plants", *Plant Cell Rep*, 17, (1998), 384-390.

64. Mauro, ML., Trovato, M., Paolis, AD., Gallelli, A., Costantino, P., Altamura, MM., "the plant oncogene rolD stimulate flowering in the transgenic tobacco plants", *Dev. Biol.*, 180, (1996), 693-700.
65. Lemcke, K., And Schmülling, T., "gain of foction assays identify non-rol genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA that alter plant morphogenesis or hormone sensitivity", *Plant J* 15, (1998), 423-433.
66. Ouarts, A., Clérot, D., Meyer, AD., Dessaux, Y., Brevet, J., Bonfill, M., "The T-DNA ORF8 of the cucumopine-type *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid is involved in auxin response in transgenic tobacco", *Plant Sci* 166, (2004), 5577-5567.
67. Otten, L., And Helfer, A., "Biological activity of the rolB-like 5' end of the A4-orf8 gene from the *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA", *Mol. Plant Microbe Interact* 14, (2001) 405-411.
68. Cardarelli, M., Mariotti, D., Pomponi, M., Spanò, L., Capone, I., Costantino, P., "*Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype", *Mol Gen Genet*; 209, (1987), 475-80.
69. Capone, I., Spano, L., Cardarelli, M., Bellincampi, D., Petit, A., Costantino, P., "Induction and growth proprieties of carrot roots with different complements of *Agrobacterium rhizogenese* T-DNA", *Plant Mol Biol*, 13, ( 1989), 43-52
70. Aoki, S., Syno, K., "Horizontal gene transfer and mutation: ngrol genes in the genome of *Nicotiana glauca*", *Proc Natl Acad Sci USA*, (1999).
71. Hansen, G., Das, A., Chilton, MD., "constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*", *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91, (1994), 7603-7607
72. Thomashow, L.S., Reeves, S., Thomashow, M.F., "Crown gall oncogenesis: evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indole-3-acetic acid", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 81, (1984), 5071-5075.
73. Akiyoski, D. E., Klee, H., Amasino, R. M., Nester, E. W., Gordon, M. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, (1984), 5994-599.
74. Buchmann, I., Marnier, F.-J., Schroder, G., Waffenschmidt, S., Schröder, J., "Tumor genes in plants: T-DNA encoded cytokinin biosynthesis", *EMBO J.* 4, (1985), 853-859.

75. Hayman, G.T., and Farrand, S.K., "Agrobacterium plasmids encode structurally and functionally different loci for catabolism of agropine type opines", *Mol. Gen. Genet*, 223, (1990), 456-473.
76. Dessaux, Y., Petit A., Farrand, S.K., Murphy, P.M., "Opines and opine-like molecules in plant *Rhizobiaceae* interactions", (1998), 173-197. In A. Kondorosi and H. Spaink (eds.). *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
77. Dessaux, Y. and Petit, A., "Opines as screenable markers for plant transformation", *Plant Molecular Biology Manual*. S. B. Gelvin and R. A. Schilperoort. Dordrecht, Kluwer Academic. C3, (1994), 1-12.
78. Riker, A.J., Banfield, W.M., Wright, W.H., Keitt, W.H., Sagen, H.E. "Studies on infectious hairy root of nursery apple trees". *J. Agricult. Sci.* 41, (1930), 507-540.
79. David, C., Chilton, M-D., and Tempe, J., "Conservation of T-DNA in plants regenerated from hairy root cultures", *Biotechnology*, 2, (1984), 73-76.
80. Hildebrand, E.M., "Life history of the hairy root organism in relation to its pathogenesis on nursery apple trees", *J. Agricult. Sci* 48, (1934), 857-885.
81. Bercetche, J., Chriqui, D., Adam, S., David, C., "Morphogenetic and cellular reorientation induced by *Agrobacterium rhizogenes* (strain 1855,2659 and 8196) on carrot, pea and tobacco", *Plant Science* 52, (1987), 195-210.
82. Chilton, W.S., Stomp, A.M., Béringue, V., Bouzar, H., Vaudequin-Dransart, V., Petit, A., Dessau, Y., "The chrisopine family of amadori-type crown gall opines". *Phytochemistry* 40 (1995), 619-628.
83. Tepfer, D., "Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes* : sexual transmission of the transformed genotype and phenotype", *Cell*, 37, (1984), 959-967.
84. Ranjit, M., Kester, D.E., Polito, V.S., "Micropropagation of cherry rootstocks : III. Correlation between anatomical and physiological parameters and root initiation", *Journal of the American society for Horticultural Science* 113, (1988), 155-159.
85. Gonzalez, A., Rodriguez, R., Sanchez-Tames, R., 1991 "Ethylene and in vitro rooting of hazelnut (*Corylus avellana*) cotyledons", *Physiologia Plantarum* 81, (1991), 227-233.

86. Wright, K., & Northcoate, D.H., "Induced root differentiation in sycamore callus", *Journal of Cell Science*, 11, (1972), 319-337.
87. Baraldi, R., Bertazza, G., Bregoli, A.M., Fasolo, F., Rotondi, A., Predieri, S., Sarafini-Fracassini, D., Slovin, J.P., Cohen, J.D., "Auxin and polyamines in relation to differential in vitro root induction on microcutting of tow pear cultivars". *J. Plant Growth Regul.* 14, (1995), 49-59
88. Hicks, G.S., "Adventitious rooting of apple microcutting in vitro", an anatomical study *Canadian Journal of Botany* 65, (1987), 1913-1920.
89. Harbage, J.F., Stimart, D.P., Evert, R.F., "Anatomy of adventitious root formation in microcutting of *malus domestica* Borkh. 'Gala'", *Journal of American society for horticultural science*, 118, (1993), 680-688
90. Zhou, J., Wu, H., Collet, G.F., Histological study of initiation and development in vitro of adventitious roots in minicuttings of apple rootstocks of M 26 and EMLA 9", *Physiologia Plantarum* 84, (1992), 433-440.
91. Binns, A.N., and Thomashow, M.F., "Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants", *Ann. Rev. Microbiol.* 42, (1988), 575-606.
92. Lippincott, B.B. and Lippincott, J.A., "Bacterial attachment to a specific wound site as an essential stage in tumor initiation by *Agrobacterium tumefaciens*". *J. Bacteriol.* 97, (1969), 620-628.
93. Hooykaas-Van Slogteren G.M.S., Hooykaas P.J.J., Schiperoort R.A., "Expression of Ti plasmid genes in monocotyledonous plants infected with *Agrobacterium tumefaciens*", *Nature* 311, (1984), 763-764
94. Sheng, J., and Citovsky, V., "*Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel", *Plant Cell* 8, (1996), 1699-1710.
95. Moore, L.W., and Cooksey D.A., "Biology of *Agrobacterium tumefaciens*: Plant Interactions", *Int. Rev. Cytol.* 13 (Suppl.), (1981), 15-46.
96. Baron, C.D., Ocallaghan, E., Lanka., "Bacterial secrets of secretion: Euroconference on the biology of type IV secretion processes", *Mol. Microbiol.* 43, (2002), 1359-1365.
97. Mullins, M.G., "Regulation of adventitious root formation in microcuttings", *Acta Horticulturae* 166, (1985), 53-61.
98. Esau, K., "Anatomy of seed plants", 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley sons, New York, USA, (1977).

99. Rugini, E., Pellegrineschi, A., Mencuccini, M., Mariotti, D. "Increase of rooting ability in the woody spices kiwi (*Actinidia deliciosa* A. Chev) By transformation with *Agrobacterium rhizogenes* rol genes", *Plant Cell Reports*, 10, (1991), 291-295.
100. Caboni, E., Lauri, P., Tonelli, M., Falasca, G., Damiano, C., "Root induction by *Agrobacterium rhizogenes* in walnut", *Plant Science*, 118, (1996), 203-208.
101. McAfee, B.J., White, E.E., Pelcher, L.E., Lapp, M.S., "Root induction in pine (*Pinus*) and larch (*Larix*) spp. Using *Agrobacterium rhizogenes*", *Plant cell Tissue Organ Cultur* 34, (1993), 53-62.
102. Tzfira, T., Yarnitzky, O., Vainstein, A., Altman, A., "Agrobacterium rhizogenes-mediated DNA transfer in *pinus halensis* Mill", *Plant Cell Reports*, 16, (1996), 26-31
103. MacRae, S. and Van Staden, J., "Agrobacterium rhizogenes mediated transformation to improve rooting ability of eucalyptus", *Tree Physiol.* 12, (1993), 411-418.
104. Casanova, E., Trillas, M.I., Moysset, L.R., Vainstein, M., "Influence of *rol* genes in floriculture", *Biotechnology Advances*, 23, (2005), 3–39.
105. Giri, A., Dhingra, V., Giri, C.C., Singh, A., Ward, O.P., Narasu, M.L., "Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects", *Biotechnol Adv*, 19, (2001), 75-199.
106. Sevon, N., and Oksman-Caldentey, KM: "Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids", *Planta Med* 68, (2002), 859-868.
107. Memelink, J., Kijne, J.W., van der Heijden, R., Verpoorte, R., "Genetic modification of plant secondary metabolite pathways using transcriptional regulators", In: *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, vol. 72., Plant cells, Zong JJ, Scheper, T (eds), Springer Verlag, (2001), 103-125.
108. Caporale, L.H., "Chemical ecology: a view from the pharmaceutical industry", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, (1995), 75-82.
109. Wink, M., "Function of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology", annual plant review volume 3. Sheffield: Sheffield Academic Press, (1999), 311–46.

110. Guillon, S., Guiller, T.J., Pati, P.K., Rideau, M., Gantet, P., "Hairy root research: recent scenario and exciting prospects Commentary", *Current Opinion in Plant Biology*, 9, (2006), 341–346
111. Yoshimatsu, K., Sudo, H., Kamada, H., Kiuchi, F., Kikuchi, Y., Sawada, J., Shimomura, K., "Tropane Alkaloid Production and Shoot Regeneration in Hairy and Adventitious Root Cultures of *Duboisia myoporoides*–*D. Leichhardtii* Hybrid", *Biol. Pharm. Bull.* 27(8), (2004), 1261–1265
112. Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B., Citovsky, V., "Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models", *Trends Genet.*, 20, (2004), 375-383.
113. Agostini, E., Coniglio, M.S., Milrad, S.R., Tigier, H.A., Giulietti, A.M., "Phytoremediation of 2,4-dichlorophenol by Brassica napus hairy root cultures", *Biotechnol Appl Biochem*, 37, (2003), 139-144.
114. Boominathan, R., Doran, P.M. "Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator", plant species. *J. Biotechnol.*, (2003).
115. Zhou, N., Tootle, T.L., Tsui, F., Klessig, D.F., Glazebrook, J., "PAD functions upstream from salicylic acid to control defense responses in *Arabidopsis*", *The Plant Cell* 10, (1998), 1021–1030.
116. Azlan, GJ., Marziah, M., Radzali, M., Johari, R., "Establishment of *Physalis minima* hairy roots culture for the production of physalins", *Plant Cell Tiss Org Cult* 69, ( 2002), 271– 278.
117. Krolicka, A., Stanszewska, I., Bielawski, K., Malinski, E., Szafranek, J., Lojkowska, E., "Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*", *Plant Sci* 160, (2001), 259-264.
118. Vanhala, L., Eeva, M., Lapinjoki, S., Hiltunen, R., Oksman-Caldentey, KM., "Effect of growth regulators on transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*", *J. Plant Physiol*, 153, (1998), 75-81
119. Morgan, JA., Barney, CS., Penn, AH., Shanks, JV., "Effect of buffered media upon growth and alkaloid production of *Catharanthus roseus* hairy roots", *Appl Microbiol Biotechnol*, 53,(2000), 262-65
120. Roy, M.C., "Plant growth response to *Agrobacterium rhizogenes* M Appl Sc", Thesis, Lincoln College, University of Canterbury, New Zealand, (1989).

121. Magnussen, D., Clapham, D., Gronroos, R., von Arnold, S., "Induction of hairy and normal roots on *Picea abies*, *Pinus Sylvestris* and *Pinus Contorta* by *Agrobacterium rhizogenes*", *Scandinavian Journal of forest research* 9, (1994), 46-5.
122. Mihalievic, S., Stipkovic, S., Jelaska, S., "Increase of root induction in *Pinus nigra* explants using agrobacteria", *Plant Cell Reports* 15, (1996), 610-614.
123. Burns, J.A., and Schwarz, O.J., "Bacterial stimulation of adventitious rooting on *in vitro* cultured slash pine (*Pinus elliotii* Engelm.) seedling explants", *Plant Cell Report* 15, (1996), 405-408.
124. Gelvin, S.B., "Crown gall disease and hairy root disease", *Plant Physiol.* 92 (1990), 281-285.
125. Frontier, S., "Stratégie d'échantillonnage en écologie", Ed : Masson, Paris & Les Presses de l'Université LAVAL, Quebec, (1983), 494p.
126. Schwaetz, D., "Méthodes statistiques. A l'usage des médecins et des biologistes", Ed : Flammarion Médecines-sciences. Paris VI<sup>e</sup> 3<sup>ème</sup> édition, (1974), 318p.
127. Krimi, Z., Petit, A., Mougel, C., Dessaux, Y., Nesme, X., "Seasonal fluctuations and long- term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. in soils", *Appl. Environ. Microbiol.* 68, (2002), 3358-3365.
128. New, P. B., and Kerr, A., "A selective medium for *Agrobacterium radiobacter* biotype 2", *J. Appl. Bacteriol.* 34, (1971), 233-236.
129. Keane, P. J., Kerr, A., New, P. B. "Crown gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates", *Aust J. Biol Sci* 23, (1970), 585-595.
130. Moore, L.W., Kado, C.I., Bouzar, H., "Agrobacterium", (1988), 16-36. In N. W Schaad (ed) *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* 2<sup>nd</sup> ed .APS Press, St. Paul, Minn,
131. Bouzar, H., Daouzli, N., Krimi, Z., Alim, A., and Khemici, E., "Crown gall incidence in plant nurseries of Algeria, characteristics of *Agrobacterium tumefaciens* strains, and biological control of strains sensitive and resistant to agrocin 84", *Agronomie* 11, (1991), 901-908.
132. Murashigue, T., and Skoog, G.F., "Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures", *Physioloplant*, 15 (1962), 473-497



133. Vincent, J.M., "Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria", IBP Handbook no. 5, Blackwell Scientific Publications, Oxford, (1970).
134. Slaoui, M., Khelifi, L., Rezine, R., Amdoun, R., Morsoli, A., Amroune, S. "Embryogenèse somatique et bourgeons néoformés induits sur explants issus de vitrosemis de *Datura stramonium* L. d'origine algérienne", Rev. Biotec. Végétales, (2006), 33-36.
135. Amdoun, R., Khelifi, L., Zarouri, B., Slaoui, M., Amroune, S., "Production de chevelus racinaires chez deux espèces de *Datura* par transformation génétique *in vitro*", Rev. Biotec. Végétales, 00, (2006), 7-9.
136. Rom, R.c. and Carlson, R.F. "Rootstocks for Fruit Crops", John Wiley & Sons. New York, (1987), 79-145.
137. Moore, L.W., and Anderson, A.R., "Host Specificity in the genus *Agrobacterium*", Phytopathology 69, (1979), 320-323.
138. Tepfer, D., "The biology of genetic transformation of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*. In A Puhler, ed, Molecular Genetics of the bacteria Plant Interaction", Springer Verlag, Berlin, (1983), pp. 248–258.
139. Lambert, C., Thomas, G., Leger, D., "Pamboukdjian N. et Tepfer D., "Utilisation de la transformation génétique par *Agrobacterium rhizogenes* pour améliorer la rhizogénèse d'arbre fruitiers", 8ième colloque sur les recherches fruitières-Bordeaux Ed. INRA-CTIFL, (1988), 73-84.
140. Altamura, M.M., "Histological events in adventitious rooting", *Agronomie* 16, (1996), 589-602.
141. Sedira, M., "Studies of Adventitious Root Formation in Woody Species. Doctoral thesis", Swedish University of Agricultural Sciences, (2006), 37p.
142. Pawlicki-Jullian, N., Sedira, M., Welander, M., "The use of *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots to obtain transgenic shoots of the apple rootstock Jork 9. Plant Cell, Tissue Organ Cult, V. 70. N°2, (2002), 163–171.
143. Tempé, J., et Shell, J., "La manipulation des plantes", La recherche, 188, (1987), 696-709.
144. Lambert, C., and Tepfer, D., "Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create transgenic apple trees having an altered organogenic response to hormones", Theor.appl genet 85, (1992), 105-109.

145. Fladung, M., Grossmann, K., Ahuja, MR., "Alterations in hormonal and developmental characteristics in transgenic *Populus* conditioned by the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes*", *J Plant Physiol*, 150, (1997), 420– 7.
146. Kaneyoshi, J., and Kobayashi, S., "Characteristics of transgenic trifoliolate orange (*Poncirus grobacter* Raf) Possessing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid", *Journal of the Japanese society for Horticultural science* 68, (1999), 734-738.
147. Zhu, L.H., Holfors, A., Ahlman, A., Xue, Z.T., Welander, M., "Transformation of the apple rootstock M.9/29 with the *rolB* gene and its influence on rooting and growth", *Plant Sci.* 160, (2001), 433\_439.
148. Zhu, L.H., Ahlman, A., Li, X.Y., Welander, M., "Integration of the *rolA* gene into the genome of the vigorous apple rootstock A2 reduced plant height and shortened internodes", *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 76, (2001a), 758-763.
149. Igarashi, M., Ogasawara, H., Hatsuyama, Y., Saito, A., Suzuki, M., "Introduction of *rolC* into Marubakaidou [*Malus prunifolia* Borkh. Var. ringo Asami Mo 84-A] apple rootstock via *Agrobacterium tumefaciens*", *Plant Science* 163, (2002), 463\_473.
150. Riker, A.J., Berbee, G.J., Smalley, E.B., "Effet of crown gall and hairy root on the growth of apple trees. *Phytopathology*, Vol. 49, (1959), 88-90.
151. Guivarc'h, A., Carneiro, M., Vilaine, F., Pautot, V., Chriqui, D., " Tissue-specific expression of the *rolA* gene mediates morphological changes in transgenic tobacco", *Plant Mol Biol*, 30,(1996), 125–34.
152. Sun, L. Y., Monneuse, M.-O., Martin-Tanguy, J., Tepfer, D., "Changes in flowering and accumulation of polyamines and hydroxycinnamic acid-polyamine conjugates in tobacco plants transformed by the *rolA* locus from the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*", *Plant Sci.*, 80, (1991), 145–156.
153. Altabella, T., Angel, E., Biondi, S., Palazon, J., Bagni, N., Pinol, M.T. "Effect of the *rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* on polyamine metabolism in tobacco roots", *Physiol. Plant.* 95, (1995), 479-485.
154. Pfosser, M., Mengl, M., Königshofer, H., and Kandeler, R., "Time course of polyamine levels during starvation of *Medicago sativa* cells and its correlation with cell cycle data", *J. Plant Physiol.* 140, (1992), 334-338.

155. Xue, Z.T., Holfors, A., Welander, M., "Intron splicing in 50 untranslated region of the rolA transcript in transgenic apple", *Journal of Plant Physiology* 165, (2006), 544—552
156. Spena, A., Schmülling, T., Koncz, C., and Schell, J., "Independent and synergistic activity of rolA, B and C loci in stimulating abnormal growth in plants", *EMBO J.*, 6, (1987), 3891-3899.
157. Faiss, M., Strnad, M., Redig, P., Doležal, K., Hanuš, J., Van Onckelen, H., et al. "Chemically induced expression of the rolC-encoded  $\beta$ -glucosidase in transgenic tobacco plants and analysis of cytokinin metabolism: rolC does not hydrolyze endogenous cytokinin glucosides in planta", *Plant J.*, 10, (1996), 33–46.
158. Bonhomme, V., Laurain Mattar, D., Fliniaux, M.A., "Effects of the rolC gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna*", *J. Nat. Prod.* 63, (2000), 1249–1252.
159. Palazón J., Cusidó R.M., Gonzalo J., Bonfill M., Morales S., Piñol M.T., "Relation between the amount the rolC gene product and indole alkaloid accumulation in *Catharantus roseus* transformed root cultures", *J. Plant Physiol*, 159, (1998b), 712–8.
160. Bulgakov VP, Khodakovskaya MV, Labetskaya NV, Chernoded GK, Zhuravlev YN. "The impact of plant rolC oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures". *Phytochemistry*, 49, (1998), 1929–34.
161. Bulgakov, VP., Tchernoded, GK., Mischenko, NP., Khodakovskaya, MV., Glazunov, VP., Zvereva EV, et al. Effects of salicylic acid, methyl jasmonate, etephone and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with rolB and rolC genes", *J., Biotechnol*, 97, (2002), 213–21.
162. Bulgakov, V.P., Tchernoded, G.K., Mischenko, N.P., Shkryl, Y.N., Glazunov, V.P., Fedoreyev, S.A., et al., "Effects of Ca<sup>2+</sup> channel blockers and protein kinase/phosphatase inhibitors on growth and anthraquinone production in *Rubia cordifolia* cultures transformed by the rolB and rolC genes", *Planta*, 217, (2003), 349–55.
163. Park, S-U., and Facchini, P.J., "*Agrobacterium* mediated transformation of *Opium poppy*, *Papaver somniferum* L., via shoot organogenesis", *Journal of Plants physiology*, 157, (2000), 207-214.
164. Kovalenko, P.G., and Maliuta, S.S., "An effect of transformation by Ri plasmids and elicitors on licorice cells and secondary metabolites production", *Ukr. Bioorg. Acta*, V. 1, 1, (2003), 50-60

165. Martins T.M., Domingos A., Novo, C., Lourencop, P.M.L., "Effect of *Agrobacterium rhizogenes* infection on in vitro rooting of *Vitis vinifera*", *Vitis*. Vol. 42 N° 3, (2003), 159-161.